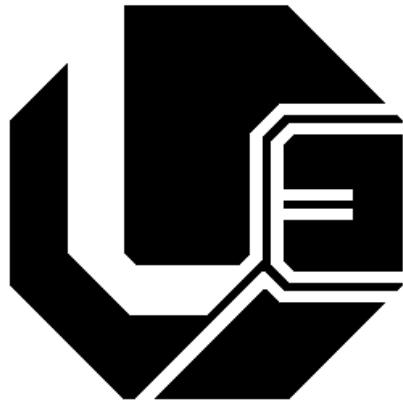


UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA



NOVAS FERRAMENTAS DE PROCESSAMENTO DE SINAIS
PARA A ANÁLISE DA CULTURA DE NEURÔNIOS CORTICais
CULTIVADOS EM DISPOSITIVOS MULTIELETRODOS

SUÉLEN MOREIRA MARQUES

SETEMBRO

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

NOVAS FERRAMENTAS DE PROCESSAMENTO DE SINAIS
PARA A ANÁLISE DA CULTURA DE NEURÔNIOS CORTICais
CULTIVADOS EM DISPOSITIVOS MULTIELETRODOS

SUÉLEN MOREIRA MARQUES

Dissertação apresentada por Suélen Moreira Marques à Universidade Federal de Uberlândia, perante a banca de examinadores abaixo, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Banca Examinadora:

João Batista Destro Filho, Orientador (UFU)

Luiz Otávio Murta Júnior, (USP)

Renata Graciele Zanon, (UFU)

Shigueshi Nomura, (UFU)

**NOVAS FERRAMENTAS DE PROCESSAMENTO DE SINAIS
PARA A ANÁLISE DA CULTURA DE NEURÔNIOS CORTICAIS
CULTIVADOS EM DISPOSITIVOS MULTIELETRODOS**

SUÉLEN MOREIRA MARQUES

Texto da dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Prof. João Batista Destro Filho, Dr.
Orientador

Prof. Alexandre Cardoso, Dr.
Coordenador do curso de Pós-Graduação

“Alguns homens veem as coisas como são e dizem ‘Por quê?’ Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”

George Bernard Shaw

*Aos meus pais com muito carinho, Leonaldo e Silvana
À minha irmã, Luana
Ao meu namorado João*

Agradecimentos

Agradeço à Deus na Santíssima Trindade por ter me criado, me abençoado e me guiado em toda à minha vida, em especial neste período de mestrado. Sem Deus nada disso poderia ter acontecido. Agradecimento também à Maria Santíssima em especial ao título de Nossa Senhora das Graças da Medalha Milagrosa por ter intercedido por mim em todas as vezes que eu clamei a sua intercessão junto à Deus, todo poderoso, com a certeza de que nunca fui abandonada/esquecida pela luz divina. Obrigada Senhor.

Aos meus pais Leonardo e Silvania, ao meu pai postiço Reinan e à minha irmã Luana, por serem meu alicerce em todas as minhas alegrias, tristezas, dificuldades e facilidades. Em especial ao Leonardo e Silvania que sempre me deram amor, alegrias, puxões de orelha, mas enfim, souberam me criar, me fazer uma pessoa boa e me deram todas as ferramentas necessárias para que eu mesma sempre buscasse meus próprios ideais e objetivos.

Ao meu namorado João por ser um amigo, companheiro e confidente. Agradeço pelos momentos que passamos durante o desenvolvimento deste trabalho pela paciência quando eu ficava nervosa, ocupada e atarefada. Agradeço pelo carinho nos momentos de stress e também pelo companheirismo em ficar ao meu lado me olhando escrever.

À toda minha família, tios, tias, primos e primas, avôs e avós, que não são poucos, pela amizade e conselhos. Por entenderem meus momentos de ausência durante a elaboração deste trabalho.

Às minhas grandes amigas Bruna, Luana, Simone e Thalita por sempre me darem força nos momentos em que eu mais necessito, entendendo principalmente minha falta de tempo de dar a devida atenção que elas merecem.

Aos meus amigos da Paróquia Nossa Senhora das Graças da Medalha Milagrosa por serem instrumento de Deus na minha vida e na vida de toda a comunidade.

Aos meus colegas de trabalho da Engeset em especial ao Humberto e Arizênia por brincarem comigo dizendo que eu matava ratinhos, o que não é verdade. À Jaqueline e Dayane por me darem muita força para conclusão deste trabalho e também pela amizade, ao José Antônio por ser um instrumento de Deus na minha vida e à Cristielly e aos colegas Fernando, Geraldo, Leandro, Lucas, Márcio, Marcus Vinícius, Oswaldo, Renato, Rodrigo e Sergio por fazerem parte da construção deste sonho.

Ao meu professor e orientador Destro/JB pela alegria e entusiasmo com os resultados deste trabalho. Por me orientar e às vezes me desorientar com tantas atividades e assuntos a serem discutidos, por me fazer aprender a ter paciência e esperar e, principalmente pelos momentos de partilha e preocupação com a Suélen - que é a única que existe no mundo.

À Universidade Federal de Uberlândia e à Faculdade de Engenharia Elétrica pelo ensino de qualidade e por possibilitarem o desenvolvimento de projetos de pesquisa e extensão desde os tempos de graduação, contribuindo diretamente com minha formação enquanto estudante e cidadã.

À Universidade de Gênova (UniGe), Itália, na figura do Prof. Sergio Martinoia, pela disponibilização dos materiais e financiamento da estadia do estudante Danilo R Campos (UFU), responsável pela mensuração dos dados aqui analisados. À Organização Internacional do Cérebro (IBRO), pelo financiamento da viagem do mesmo estudante.

Enfim, agradeço a todos, incluindo aqueles que não foram mencionados nos parágrafos anteriores, mas que de uma forma ou de outra, me ajudaram e contribuíram para a conclusão de mais uma etapa da minha trajetória acadêmica.

Resumo

MARQUES, Suélen Moreira. *Novas ferramentas de processamento de sinais para a análise da cultura de neurônios corticais cultivados em dispositivos multieletrodos*. Uberlândia: FEELT – UFU, 2012, 149 f.

Nesta dissertação analisa-se a atividade elétrica de experimentos gravados durante a maturação de culturas dissociadas, retiradas do hipocampo de embriões de ratos Wistar, baseado em dispositivos denominados Matrizes Multieletrodo (MEA). As análises ocorrem desde a deposição da cultura no dispositivo até sua morte, de 0 a 88 dias *in vitro* (DIV). A análise clássica de *spikes* foi aplicada a diferentes culturas, mostrando a evolução de seus *spikes* e *bursts*. Uma atenção particular é dedicada para a última etapa associada à morte celular, já que um inesperado crescimento da amplitude da atividade elétrica é observado neste trabalho. Além da análise clássica de *spikes* aplicaram-se outras técnicas de processamento de sinais, como cálculo da Transformada de Fourier, Autocorrelação, Densidade Espectral de Potência, Detecção de Picos, Coerência, Análise de Flutuações Destendenciadas (DFA), Estacionariedade e Gaussianidade. Observou-se do DIV 08 ao DIV 28 pela análise clássica de *spikes*, DFA, Estacionariedade e Gaussianidade que a cultura é predominantemente estacionária e gaussiana e existe uma variabilidade do comportamento nos canais apresentando correlação de longo-alcance. Ao analisar o DIV 29 ao DIV 71 observa-se que a cultura se estabiliza se enquadrando como ruído branco e apresentando atividade elétrica não estacionária e não gaussiana. Nos estágios finais de desenvolvimento da cultura (DIV's 72 à 88) ocorre uma desorganização da atividade elétrica seguida por uma inesperada elevação da quantidade de *spikes* e *bursts* e, posteriormente, ocorre a morte celular.

Palavras-chave: Conexão funcional. Cultura neural dissociada. Matriz multieletrodo. Processamento de sinais biológicos.

Abstract

MARQUES, Suélen Moreira. *Novas ferramentas de processamento de sinais para a análise da cultura de neurônios corticais cultivados em dispositivos multieletrodos*. Uberlândia: FEELT – UFU, 2012, 149 f.

This dissertation analyses the electrical activity recorded in experiments involving the maturation of dissociated embryonic hippocampal cultures, using Multielectrode Array (MEA) devices, starting from the moment of the culture's placement in the device until its death, a period of 0 to 88 days *in vitro* (DIV). Classical “spike” analysis is applied to different cultures, showing the progression of “spikes” and “bursts”. Particular attention is devoted to the last step associated with cellular death, as an unexpected rise in electrical activity amplitude is observed. In addition, other techniques such as Fourier Transform, Autocorrelation, Power Spectral Density, Peak Detection, Coherence, Detrended Fluctuation Analysis (DFA), Stacionarity and Gaussian were applied. It's possible to observe, from DIV 08 to DIV 28, by classical analysis of spikes, DFA, Stacionarity and Gaussian, culture is predominantly stationary and gaussian and there is variability in the behavior of channels showing long-range correlation. Analyzing the DIV 29 to 71 we could observe that the culture stabilizes like white noise and displaying electrical activity not stationary and not gaussian. In the later stages of development (DIV's 72 to 88) there is a disruption of electrical activity followed by an unexpected increase in the amount of spikes and bursts and, subsequently, cell death occurs.

Key-words: Biological signal processing. Dissociated neural culture. Functional connectivity. Multielectrode array.

Lista de Figuras

Figura 2. 1 - Resumo esquemático da preparação da cultura primária de neurônios. A - Etapa de dissecação: os cérebros de cada embrião são extraídos para então isolar os tecidos corticais e hipocampo. B - Etapa de dissociação: os tecidos são tratados três vezes com soluções enzimáticas e com meio nutritivo. C - Etapa de manutenção: as células e o meio nutritivo são adicionados em recipientes de cultura, os quais serão armazenados em estufas.	22
Figura 2. 2 - A- Foto de uma matriz multieletrodo (MEA) sem a cultura. B- Substrato da MEA destacando os microeletrodos ao centro. C- Micrografia dos eletrodos dispostos sobre o substrato, indicando suas dimensões.	25
Figura 2.3 - (A) Área de trabalho dos experimentos. (B) Visualização do software MCRack na tela.	27
Figura 2. 4 - Cultura de neurônios sobreposta à uma MEA (à esquerda) e a interface do MCRack (à direita)	28
Figura 2. 5 - Atividade elétrica típica de um eletrodo da matriz multieletrodo. Escala vertical: amplitude [μ V] e escala horizontal: tempo [s].	29
Figura 2. 6 – Detecção de <i>spikes</i>	30
Figura 2. 7 – Detecção de <i>bursts</i>	31
Figura 2. 8 - Sinal de um microeletrodo da MEA com os respectivos <i>spikes</i> identificados pelos pontos vermelhos.....	37
Figura 2. 9 - Expoente de Alfa médio para os DIV's 08 à 88.....	37
Figura 2. 10 - Expoente de Hurst médio para os DIV's 08 à 88.....	38
Figura 2. 11 - Gráfico de atividade elétrica do experimento 364, canal 83, DIV11	39
Figura 2. 12 - Gráfico de Raster Plot do experimento 364 DIV 08	39
Figura 2. 13 - Intervalo entre <i>spikes</i> (ISI) médio para cada cultura ao longo do tempo.	40
Figura 2. 14 - Intervalo entre <i>bursts</i> (IBI) médio para cada cultura ao longo do tempo.....	40
Figura 2. 15 - Intervalo entre <i>spikes</i> por região para o experimento 364 DIV 08	41

Figura 2. 16 - Desvio-padrão do intervalo entre <i>spikes</i> por região para o experimento 364 DIV 08	42
Figura 2. 17 - Intervalo entre <i>bursts</i> por região para o experimento 364 DIV 08	43
Figura 2. 18 - Desvio-padrão do intervalo entre <i>bursts</i> por região para o experimento 364 DIV 18	43
Figura 2. 19 - Número de canais que possuem apenas ruído e apenas <i>spikes</i> e/ou <i>bursts</i> ao longo do tempo.....	44
Figura 2. 20 - Histograma de intervalos entre <i>spikes</i>	45
Figura 2. 21 - Histograma de intervalos entre <i>bursts</i>	45
Figura 2. 22 - Número total de <i>spikes</i> para cada DIV.	46
Figura 2. 23 - Número médio de <i>spikes</i> que formam <i>bursts</i> em cada DIV.	46
Figura 2. 24 - Porcentagem de <i>spikes</i> aleatórios em cada DIV.....	47
Figura 2. 25 - Número total de <i>bursts</i> em cada DIV.	47
Figura 2. 26 - Número médio de <i>spikes</i> por <i>burst</i> em cada DIV.	47
Figura 2. 27 - Duração média dos <i>bursts</i> em cada DIV.....	48
Figura 3. 1 – Disposição dos eletrodos de uma Matriz Multieletrodo	61
Figura 3. 2 - Sinais registrados de atividade espontânea (Basale3) para os canais 32, 33, 43, 68, 77 e 78.....	63
Figura 3. 3 - Sinais registrados de atividade estimulada por APV para os canais 32, 33, 43, 68, 77 e 78.....	64
Figura 3. 4 - Transformada de Fourier de uma senóide de amplitude 0.7 e freqüência de 50 Hz	66
Figura 3. 5 - Função autocorrelação de uma senóide de amplitude 0.7 e freqüência de 50 Hz	67
Figura 3. 6 - Densidade espectral de potência calculada para uma senóide de amplitude 0.7 e frequência de 50 Hz	69

Figura 3. 7 - Detecção de Picos calculada para de uma senóide de amplitude 0.7 e frequência de 50 Hz	70
Figura 3. 8 - Calculo da Coerência de um sinal 1 de 5Hz com um sinal 2 de 50 Hz.....	72
Figura 3. 9 - Trasformada de Fourier calculada a partir de um intervalo de 0 a 100ms, acima, para um sinal de atividade espontânea (Basale3) e, abaixo, para um sinal de atividade estimulada (APV3_1).	73
Figura 3. 10 - Trasformada de Fourier calculada a partir de um intervalo de 0 a 100ms, comparando o sinal de atividade espontânea com o de atividade estimulada no canal 33 (acima), canal 43 (ao centro) e canal 78 (abaixo).	74
Figura 3. 11 - Autocorrelação calculada a partir de um intervalo de 0 a 100ms, acima, para médias de um sinal de atividade espontânea (Basale3) e, abaixo, para um sinal de atividade estimulada (APV3_1).	75
Figura 3. 12 - Autocorrelação calculada a partir de um intervalo de 0 a 100ms, comparando o sinal de atividade espontânea com o de atividade estimulada em relação à média dos canais 32, 33 e 43 (acima) e à média dos canais 68, 77 e 78 (abaixo).....	76
Figura 3. 13 - Densidade Espectral de Potência calculada a partir de um intervalo de 0 a 100ms, acima, para médias de um sinal de atividade espontânea (Basale3) e, abaixo, para um sinal de atividade estimulada (APV3_1).	77
Figura 3. 14 - Densidade Espectral de Potência calculada a partir de um intervalo de 0 a 100 ms, comparando o sinal de atividade espontânea com o de atividade estimulada em relação à média dos canais 32, 33 e 43 (acima) e à média dos canais 68, 77 e 78 (abaixo).	78
Figura 3. 15 - Detecção de picos calculada a partir de um intervalo de 0 a 100ms, acima, para um sinal de atividade espontânea (Basale3) e, abaixo, para um sinal de atividade estimulada (APV3_1).....	79
Figura 3. 16 - Detecção de picos calculada a partir de um intervalo de 0 a 100ms, comparando o sinal de atividade espontânea com o de atividade estimulada entre os canais 33 e o 43 (acima) e entre os canais 33 e 78 (abaixo).....	80

Figura 3. 17 - Função Coerência calculada a partir de um intervalo de 0 a 100ms, acima, para um sinal de atividade espontânea (Basale3) e, abaixo, para um sinal de atividade estimulada (APV3_1).....	81
Figura 3. 18 - Função Coerência calculada a partir de um intervalo de 0 a 100ms, comparando o sinal de atividade espontânea com o de atividade estimulada entre os canais 33 e o 43 (acima) e entre os canais 33 e 78 (abaixo).....	82
Figura 4. 1 - Ajuste da função $F(l)$ por uma reta no gráfico log-log: o coeficiente angular da reta indica o valor do coeficiente ν . Observa-se o aumento característico de $F(l)$ com o aumento do tamanho da janela l	95
Figura 4. 2 - Expoente de Alfa médio para os DIV's 08 à 88.....	104
Figura 4. 3 - Expoente de Hurst médio para os DIV's 08 à 88.....	105
Figura 4. 4 - Gráficos de atividade elétrica do experimento 364, canal 83: (A) DIV11, (B) DIV36, (C) DIV78 e (D) DIV88.....	107
Figura 4. 5 - Gráficos de Raster Plot do experimento 364: (A) DIV 08, (B) DIV 18, (C) DIV 29, (D) DIV 53, (E) DIV 67, (F) DIV 71, (G) DIV 74, (H) DIV 81 e (I) DIV 88.....	108
Figura 4. 6 - Intervalo entre <i>spikes</i> (ISI) médio para todas as culturas ao longo do tempo....	109
Figura 4. 7 - Intervalo entre <i>bursts</i> (IBI) médio para todas as culturas ao longo do tempo...110	110
Figura 4. 8 - Intervalo entre <i>spikes</i> por região para o experimento 364: (A) DIV 08, (B) DIV 18, (C) DIV 29, (D) DIV 53, (E) DIV 67, (F) DIV 71, (G) DIV 74, (H) DIV 81 e (I) DIV 88.	112
Figura 4. 9 - Desvio-padrão do intervalo entre <i>spikes</i> por região para o experimento 364: (A) DIV 08, (B) DIV 18, (C) DIV 29, (D) DIV 53, (E) DIV 67, (F) DIV 71, (G) DIV 74, (H) DIV 81 e (I) DIV 88.....	113
Figura 4. 10 - Intervalo entre <i>bursts</i> por região para o experimento 364: (A) DIV 08, (B) DIV 18, (C) DIV 29, (D) DIV 53, (E) DIV 67, (F) DIV 71, (G) DIV 74, (H) DIV 81 e (I) DIV 88.	114

Figura 4. 11 - Desvio-padrão do intervalo entre <i>bursts</i> por região para o experimento 364: (A) DIV 08, (B) DIV 18, (C) DIV 29, (D) DIV 53, (E) DIV 67, (F) DIV 71, (G) DIV 74, (H) DIV 81 e (I) DIV 88.....	115
Figura 4. 12 - Número de canais que possuem apenas ruído e apenas <i>spikes</i> e/ou <i>bursts</i> ao longo do tempo, média tomada sobre todas as culturas.	116
Figura 4. 13 - Número total de <i>spikes</i> para cada DIV, média tomada sobre todas as culturas.	118
Figura 4. 14 - Número médio de <i>spikes</i> que formam <i>bursts</i> em cada DIV, média tomada sobre todas as culturas.	118
Figura 4. 15 - Porcentagem de <i>spikes</i> aleatórios em cada DIV, média tomada sobre todas as culturas.....	119
Figura 4. 16 - Número total de <i>bursts</i> em cada DIV, média tomada sobre todas as culturas. 119	
Figura 4. 17 - Número médio de <i>spikes</i> por <i>burst</i> em cada DIV, média tomada sobre todas as culturas.....	120
Figura 4. 18 - Duração média dos <i>bursts</i> em cada DIV, média tomada sobre todas as culturas.	121
Figura 5. 1 - A) Porcentagem de Segmentos Não-Estacionários para os DIV's 08, 18, 29, 53, 67, 71, 74, 81 e 88. B) Desvio Padrão da Porcentagem de Segmentos Não Estacionários para os DIV's 08, 18, 29, 53, 67, 71, 74, 81 e 88.	138
Figura 5. 2 - A) Porcentagem de Segmentos Não Gaussianos para os DIV's 08, 18, 29, 53, 67, 71, 74, 81 e 88. B) Desvio Padrão da Porcentagem de Segmentos Não Gaussianos para os DIV's 08, 18, 29, 53, 67, 71, 74, 81 e 88.....	139
Figura 5. 3 - Quantidade de segmentos não estacionários para uma janela de 40 ms: (A) DIV 08, (B) DIV 18, (C) DIV 29, (D) DIV 53, (E) DIV 67, (F) DIV 71, (G) DIV 74, (H) DIV 81 e (I) DIV 88A).	141
Figura 5. 4 - Quantidade de segmentos não gaussianos para uma janela de 40 ms: (A) DIV 08, (B) DIV 18, (C) DIV 29, (D) DIV 53, (E) DIV 67, (F) DIV 71, (G) DIV 74, (H) DIV 81 e (I) DIV 88A).	142

Lista de Tabelas

Tabela 2. 1 - Parâmetros utilizados no processamento dos dados	36
Tabela 2. 2 - Síntese das principais características dos estudos da literatura dedicados à análise da maturação de culturas neurais, baseados em registros de atividade elétrica espontânea.....	52
Tabela 2. 3 - Síntese dos principais fenômenos e interpretações ligadas às diversas etapas do processo de maturação de culturas neurais.	53
Tabela 6. 1 - Conclusões gerais dos resultados encontrados	148

Sumário

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS.....	xv
SUMÁRIO	xvi
CAPÍTULO 1.....	19
ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	19
CAPÍTULO 2.....	21
A MATRIZ MULTIELETRODO E O CRESCIMENTO DA CULTURA	21
2.1 INTRODUÇÃO.....	21
2.2 CULTURA PRIMÁRIA DE NEURÔNIOS	22
2.3 MATRIZES MULTIELETRODO	24
2.4 <i>SOFTWARE SPIKEMANAGER</i>	32
2.5 CRESCIMENTO DA CULTURA	49
2.6 REFERÊNCIAS	55
CAPÍTULO 3.....	59
APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS MATEMÁTICAS PARA CÁLCULO DA TRANSFORMADA DE FOURIER, AUTOCORRELAÇÃO, DENSIDADE ESPECTRAL DE POTÊNCIA, DETECCÃO DE PICOS E COERÊNCIA	59
3.1 INTRODUÇÃO.....	59
3.1.1 ESTADO-DA-ARTE DA ATIVIDADE ESPONTÂNEA	60
3.1.2 ESTADO-DA-ARTE DA ATIVIDADE ESTIMULADA	60
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	61

3.2.1 OS SINAIS DA MEA	61
3.2.2 TRANSFORMADA DE FOURIER.....	64
3.2.3 AUTOCORRELAÇÃO	66
3.2.4 DENSIDADE ESPECTRAL DE POTÊNCIA.....	68
3.2.5 DETECÇÃO DE PICO.....	69
3.2.6 COERÊNCIA	70
3.3 RESULTADOS	73
3.3.1 TRANSFORMADA DE FOURIER	73
3.3.2 AUTOCORRELAÇÃO	75
3.3.3 DENSIDADE ESPECTRAL DE POTÊNCIA.....	77
3.3.4 DETECÇÃO PICO	79
3.3.5 COERÊNCIA	81
3.4 DISCUSSÃO.....	83
3.4.1 SINAIS DE ATIVIDADE ESPONTÂNEA	83
3.4.2 SINAIS DE ATIVIDADE ESTIMULADA.....	84
3.4.3 AS FERRAMENTAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS SINAIS MEA	85
3.5 CONCLUSÕES	87
3.6 REFERÊNCIAS	88
CAPÍTULO 4.....	90
ANÁLISE DA EVOLUÇÃO DE CULTURAS NEURAIS ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS CLÁSSICAS DE PROCESSAMENTO DE SINAIS E DFA.....	90
4.1 INTRODUÇÃO.....	90
4.2 ANÁLISE DE FLUTUAÇÕES DESTENDENCIONADAS	93
4.3 METODOLOGIA.....	99

4.3.1 CULTURAS DE CÉLULAS.....	99
4.3.2 PROCESSAMENTO DE SINAIS.....	100
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
4.4.1 RESULTADOS ASSOCIADOS AO DFA E EXPOENTE DE HURST	103
4.4.2 RESULTADOS LIGADOS AO PROCESSAMENTO CLÁSSICO VIA <i>SPIKEMANAGER</i>	106
4.4.3 RESULTADOS LIGADOS À MORTE CELULAR.....	121
4.5 CONCLUSÕES	124
4.5.1 RESULTADOS ASSOCIADOS À APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS NÃO-LINEARES (DFA E HURST).....	124
4.5.2 RESULTADOS ASSOCIADOS À APLICAÇÃO DO <i>SPIKEMANAGER</i>	125
4.6 REFERÊNCIAS	128
 CAPÍTULO 5.....	133
ANÁLISE DO CRESCIMENTO DA CULTURA ATRAVÉS DO PROCESSAMENTO DA GAUSSIANIDADE E ESTACIONARIEDADE.....	133
5.1 INTRODUÇÃO.....	133
5.2 METODOLOGIA.....	135
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	137
5.4 CONCLUSÕES	143
5.5 REFERÊNCIAS	145
 CAPÍTULO 6.....	146
CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS.....	146

Capítulo 1

Estrutura da Dissertação

Nesta dissertação serão abordados vários quantificadores utilizados para processamento e posterior análise de sinais neuronais retirados de córtex de culturas de embriões de ratos Wistar com 18 dias de gestação.

O capítulo 2 abordará inicialmente o tipo de cultura que utilizamos neste trabalho e como a mesma é preparada. Posteriormente será discutido o que são MEAs (matrizes multieletrodo) e serão explicitadas quais as MEAs foram utilizadas na coleta dos dados. São também apresentadas imagens do laboratório utilizado para captação dos sinais e é detalhado o que são *spikes*, *bursts*, atividade basal, série de intervalo entre *spikes* e como é feito para detecção de *spikes* e *bursts*. Além disso, é apresentado ao leitor, o *software* para processamento da técnica clássica de detecção de *spikes* e os quantificadores utilizados na análise são todos explicados. Por fim, no capítulo 2 foi sintetizado vários artigos encontrados na literatura acerca do desenvolvimento da cultura desde o seu nascimento até a fase de maturação.

No capítulo 3 se encontrará técnicas avaliadas neste estudo e utilizadas para processamento dos sinais, tais como cálculo da Transformada de Fourier, Autocorrelação, Densidade Espectral de Potência, Detecção de Picos e Coerência. São apresentados os cálculos teóricos destas ferramentas e, posteriormente, elas são aplicadas nos sinais gravados a partir das MEAs. Uma observação importante é que neste capítulo são processados dados de atividade elétrica normal e espontânea e dados de atividade elétrica estimulada. Isso é importante, pois é possível comparar diferentes sinais utilizando-se as mesmas ferramentas.

O capítulo 4 apresenta os resultados do processamento e análise dos sinais desde a fase inicial da cultura até a sua morte celular. São calculados os quantificadores apresentados no capítulo 2 de culturas desde o DIV (dia *in vitro*) 08 até o DIV 88. Além de se obter o comportamento da cultura em todo período da sua existência, calculou-se outro quantificador responsável pela análise de flutuações destendencionadas (DFA).

O capítulo 5, enfim, mostra resultados adicionais de dois quantificadores matemáticos que calculam a estacionariedade e a gaussianidade do sinal. É possível observar se o intervalo de tempo analisado possui alguma correlação com a janela anterior e classificar se o sinal é, na maior parte do tempo, estacionário e/ou gaussiano.

Este trabalho, portanto, visa mapear uma cultura ao longo do tempo utilizando diferentes ferramentas e comparando-as, podendo em trabalhos futuros estudar a eficiência de cada uma delas.

Capítulo 2

A Matriz Multieletrodo e o Crescimento da Cultura

2.1 INTRODUÇÃO

Em condições adequadas, a maioria das células pode viver, reproduzir-se e até mesmo expressar suas propriedades em uma placa de cultura, ou seja, *in vitro* (ALBERTS et al., 2006). As culturas de células animais são realizadas a partir do isolamento de células de tecidos vivos, que são adicionadas em placas de cultivo contendo meio nutritivo (COOPER & HAUSMAN, 2007). As culturas estabelecidas diretamente de um tecido vivo são denominadas culturas primárias. Quando as células das culturas primárias preenchem toda a superfície da placa, parte delas deve ser removida e colocada em uma nova placa para haver a expansão celular. Esse processo é chamado de “repique” e a cultura dele derivada recebe, por alguns autores, a denominação de “cultura secundária” (ALBERTS et al., 2006).

Existem diferentes tipos de células animais utilizadas em culturas, das quais se podem destacar os neurônios, células especiais capazes de restabelecerem conectividade *in vitro*, semelhante àquela presente no tecido vivo. Assim, é possível estudar aspectos da comunicação entre neurônios como, por exemplo, os impulsos elétricos emitidos (potenciais de ação) por meio de biossensores (LAKARD et al., 2005; GRISCOM et al., 2002).

2.2 CULTURA PRIMÁRIA DE NEURÔNIOS

(A) Origem das células

Neste trabalho são utilizados neurônios do córtex e do hipocampo cerebral, obtidos de seis a oito embriões de ratos Wistar em seu 18º dia de desenvolvimento (NOVELINO et al., 2003). Os procedimentos para a preparação do protocolo dessa cultura estão resumidos na Figura 2.1.

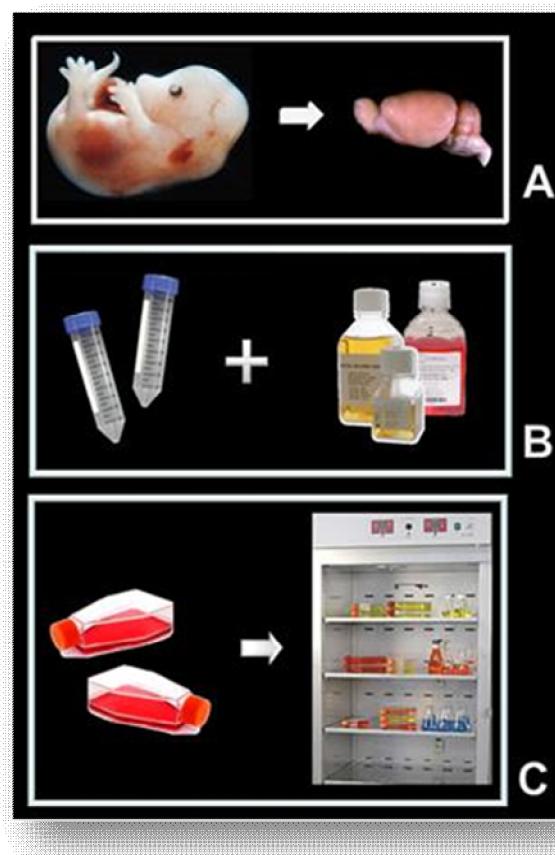


Figura 2. 1 - Resumo esquemático da preparação da cultura primária de neurônios (NOVELINO et al., 2003). A - Etapa de dissecação: os cérebros de cada embrião são extraídos para então isolar os tecidos corticais e hipocampo. B - Etapa de dissociação: os tecidos são tratados três vezes com soluções enzimáticas e com meio nutritivo. C - Etapa de manutenção: as células e o meio nutritivo são adicionados em recipientes de cultura, os quais serão armazenados em estufas.

(B) Dissecção

Os embriões são retirados de uma ou mais ratas grávidas. As partes do cérebro que serão utilizadas são removidas com a ajuda de um fórceps afiado e, em seguida, são cortadas em pedaços menores (NOVELINO et al., 2003). Todo o procedimento de dissecção ocorre em ambiente esterilizado, como aquele de uma capela de fluxo laminar (Figura 2.1(A)).

(C) Dissociação

Nessa etapa, o córtex e o hipocampo de cada cérebro passam por diversos momentos de digestão enzimática e subsequente maceração (NOVELINO et al., 2003). Esse procedimento é importante para que as células sejam isoladas, permitindo maior homogeneidade na amostra final, onde a concentração de células deve ser 8×10^5 neurônios/mL (Figura 2.1(B)).

(D) Manutenção

A cultura é mantida em uma estufa umedecida a 37 °C, com atmosfera de 5% CO₂. O meio nutritivo é trocado a cada quatro dias por meio fresco e o cultivo das células é realizado em monocamada, com inibição do crescimento de células da glia (NOVELINO et al., 2003). Os experimentos são executados somente após duas semanas (Figura 2.1(C)).

2.3 MATRIZES MULTIELETRODO

Toda a discussão apresentada na sessão de introdução deste capítulo envolve principalmente profissionais ligados à pesquisa na área biomédica. Paralelamente, pesquisadores em Engenharia Biomédica desenvolvem mecanismos microtecnológicos que traduzem um impulso nervoso de um neurônio em informação para circuitos eletrônicos, efetuando um registro digital destes potenciais de ação e, ainda, possibilitando controlar esse impulso local através do conceito de “neuromodulação controlada” (FROMHERZ, 2003). Um exemplo desses microdispositivos é a matriz multieletrodo (MEA), na qual é possível estimular e fazer a aquisição de sinais elétricos a partir de culturas neurais, de maneira não-destrutiva (POTTER & DE-MARSE, 2001). Ela capta a atividade elétrica espontânea de um grupo de neurônios, sendo esta atividade extracelular com amplitude variando entre 20 e 40 μ V. Além disso, a frequência de amostragem varia entre 05 e 48 kHz.

Muito embora as novas opções de culturas baseadas em linhagem celular imortal já incluam alguns tipos de neurônios, os experimentos atuais em MEA utilizam quase sempre culturas primárias de neurônios (FROMHERZ, 2003; NOVELINO et al., 2003; RUTTEN, 2002; POTTER, 2001). Deve-se destacar ainda que uma cultura primária é inviável por longos períodos (NOVELINO et al., 2003), geralmente não sobrevivendo por mais de dois meses, mesmo em ambiente limpo de estufa (POTTER, 2001).

A matriz multieletrodo, desde o seu desenvolvimento nos anos 70, é considerada como uma tecnologia potencialmente útil para estudos de processamento de informações em redes do sistema nervoso (MERCER & WHITE, 1978). A principal característica de uma MEA é o intercâmbio bidirecional de informação que ela proporciona, no qual atua como uma interface bioeletrônica, do mundo biológico com o eletrônico, onde células neurais são cultivadas sob um microcircuito elétrico (RUTTEN, 2002). Essa situação oferece um ambiente controlado no qual as células vão se aderir a partir de moléculas de adesão conhecidas, possibilitando seu monitoramento constante por um período de dias a semanas (CLAVEROL-TINTURÉ et al., 2005).

As MEAs representam circuitos de dimensões micrométricas (Figura 2.2) montados sobre um substrato transparente integrado a um número de 10-100 microeletrodos de 10 µm de diâmetro, geralmente (RUTTEN, 2002). Elas estão comercialmente disponíveis e são usadas para estudar a atividade e a plasticidade do sistema nervoso durante o desenvolvimento das redes neurais em culturas celulares ou em fatias cerebrais (RUTTEN, 2002; RUTTEN et al., 2001). Isso é possível a partir da aquisição de potenciais elétricos extracelulares, visando a análise de aglomerados, pequenos grupos de células neurais (FREEMAN, 2000). Além disso, essa tecnologia pode ser aplicada em qualquer tecido eletrofisiológico, ou seja, que exibe características elétricas, por exemplo, neurônios, cardiomiócitos e células musculares.

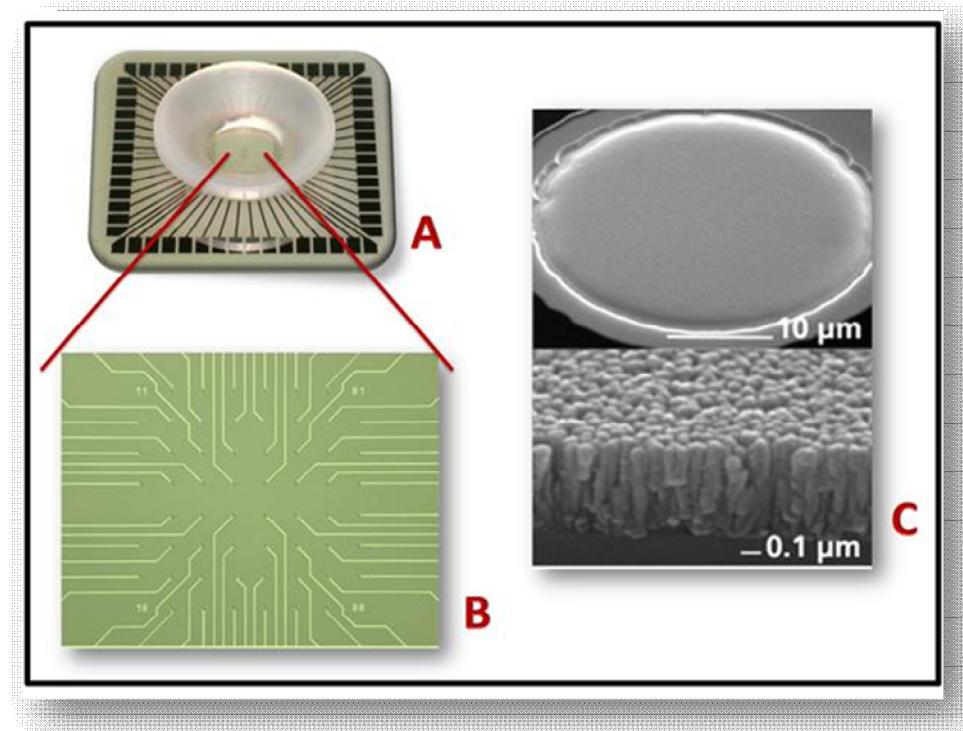


Figura 2. 2 - A- Foto de uma matriz multieletrodo (MEA) sem a cultura. B- Substrato da MEA destacando os microeletrodos ao centro. C- Micrografia dos eletrodos dispostos sobre o substrato, indicando suas dimensões (MULTI CHANNEL SYSTEMS, 2005).

As MEAs são atualmente empregadas não apenas para estudos da informação biológica neural (RIKE, 1997), como também para aplicações em farmacologia (CHIAPPALONE, 2003) e neuroimplantes. Estes últimos são dispositivos protéticos que controlam ou substituem partes lesionadas do hipocampo (WAGENAAR, 2007; LAKARD et al., 2005;

GRISCOM et al., 2002) ou minimizam crises epilépticas (LITT, 2003). No último caso, a atuação da MEA é extremamente relevante, pois 25% dos portadores de epilepsia não respondem a medicamentos anticonvulsivantes, que constituem a terapia mais comum; e, dentre os pacientes que recebem medicação, estima-se que 50% apresentem efeitos colaterais. Assim sendo, a grande quantidade de portadores de epilepsia, cujo tratamento é atualmente sem sucesso ou que sofrem de efeitos colaterais nocivos oriundos da medicação, exige a busca de novas soluções, motivando, portanto, as pesquisas realizadas com a MEA (COCKERELL, 1998).

Além disso, a MEA constitui um sistema *in vitro* ideal para monitorar os efeitos de drogas e toxinas, promovendo conclusões importantes sobre a atuação bioquímica específica para o estudo também de novos fármacos (POTTER & DE-MARSE, 2001). Ao mesmo tempo, a MEA também permite monitorar facilmente o desenvolvimento da morfologia das células, já que possui um substrato transparente, adequado para se fazer visualizações em microscópios invertidos, de fluorescência, confocal ou de varredura dupla (POTTER & DE-MARSE, 2001).

Existem diversas limitações e desafios técnicos que impedem a aplicação clínica dos neuroimplantes, cuja implementação física está intimamente ligada ao desenvolvimento do conhecimento acerca de detalhes importantes associados aos dispositivos MEA (TAKETANI, 2006). Dentre estes desafios, pode-se citar o processo de conexão funcional e morfológica entre os neurônios e os eletrodos da MEA, o qual não é muito bem conhecido (SPORNS, 2004). Após a deposição do tecido sobre o circuito, em geral se espera de 10 a 15 dias para constatar aproximações físicas que resultam numa atividade neural espontânea de grande amplitude. Muitas vezes, porém, a prática laboratorial revela que tais aproximações podem não ocorrer, levando a uma cultura inativa, mas por qual motivo? Do ponto de vista prático, a ausência de conexão pode ser explicada ou por incompatibilidade biológica ou dificuldade de adesão do tecido ao dispositivo. Tais fatos podem se revelar bastante inconvenientes no momento da utilização do neuroimplante, pois a incompatibilidade pode evoluir para reação imunológica severa, incluindo potenciais perigos ao paciente; e a não-adesão pode perturbar o funcionamento do dispositivo, devido à baixa amplitude dos sinais.

A MEA utilizada neste trabalho é a MEA60 (MULTI CHANNEL SYSTEMS, 2005) que contém 60 microeletrodos de 30 micrômetros de diâmetro cada e 200 micrômetros de espaçamento entre eles. Esses eletrodos são distribuídos em uma matriz 8x8, com os cantos excluídos. Cada registro de atividade elétrica seguiu o mesmo procedimento: as MEAs povoadas com as culturas eram retiradas da estufa de CO₂ na qual eram mantidas e colocadas sobre um amplificador cuja temperatura era controlada, podendo variar de 37,1 a 37,4 °C. As medidas eram iniciadas após 20 minutos, com o objetivo de permitir às células se adaptarem ao novo ambiente. Em cada experimento coletaram-se 20 minutos de amostra do sinal da MEA, divididos em quatro fases de 5 minutos cada, sendo as medidas subsequentes.

É importante salientar que todas as MEAs utilizadas possuíam referimento interno, sendo este o eletrodo 15. Em todas as MEAs que foram coletados sinais, o eletrodo 15 não possui registro de atividade neural, apenas o sinal de fundo, que corresponde aos ruídos que influenciam no sinal (térmicos, elétricos, entre outros). Por este motivo, para toda e qualquer análise dos sinais, sempre deve ser excluída a atividade observada no eletrodo 15. A frequência de aquisição dos sinais para os experimentos desta dissertação foi de 10 kHz.

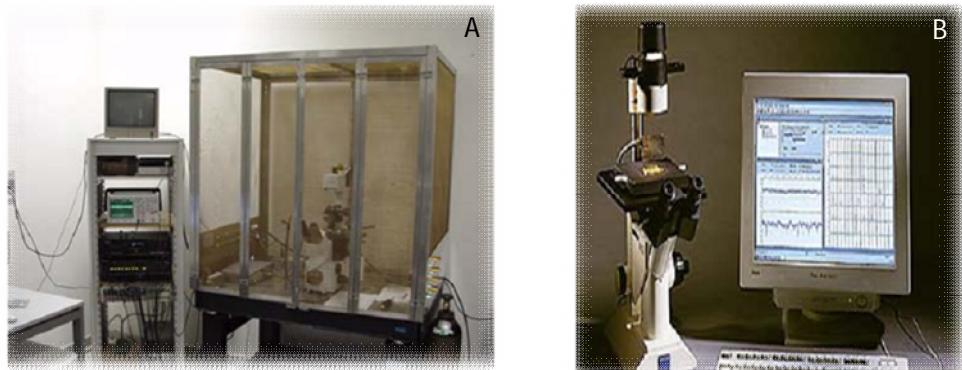


Figura 2.3 - (A) Área de trabalho dos experimentos. (B) Visualização do *software* MCRack na tela (Fonte: adaptado de (CHIAPPALONE, 2003)).

Como mencionado acima, a MEA é constituída de 60 microeletrodos que conectados a um amplificador formam um conjunto de 60 amplificadores compreendendo estágios de pré-amplificação e amplificação propriamente dita com ganho total absoluto de 1200. Na Figura

2.3(A) é mostrada a área de trabalho dos experimentos. Neste local, são necessários um microscópio invertido, uma mesa antivibratória, um controlador de temperatura, uma gaiola de Faraday e um computador equipado com placa PCI de aquisição de dados com no máximo 128 canais de registro e 12 bits de resolução. Os dados foram monitorados e gravados usando o *software* comercial MCRack (vide Figura 2.3(B), que permite monitorar os sinais em tempo real por um longo prazo de aquisição à partir do *Multi Channel Systems (MCS)*.

O *software* MC_Rack apresentado na Figura 2.4 armazena os dados brutos, trechos de atividade fisiológica, intervalo entre um conjunto de impulsos nervosos e outro, razão entre os potenciais extracelulares e, além disso, o usuário poderá escolher a taxa de amostragem de dados e escolher a tensão em uma escala de +/- 400 mV à +/- 4V.

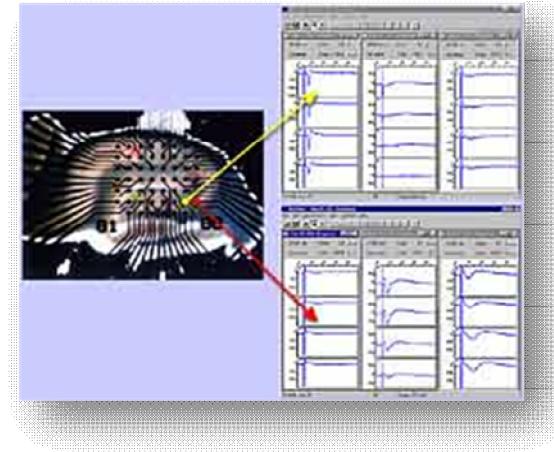


Figura 2. 4 - Cultura de neurônios sobreposta à uma MEA (à esquerda) e a interface do MCRack (à direita)

Um sinal gravado a partir das MEAs possui uma parte constituída de picos e outra parte sem atividade elétrica denominada atividade basal. A partir disso, pode-se dizer que alguns desses picos são *spikes*. A Figura 2.5 apresenta um sinal em um microeletrodo, composto por *spikes* que são variações extremamente rápidas de tensão elétrica, podendo ser interpretadas como o resultado da ativação de grupos de células situados exatamente sobre um microeletrodo (TAKETANI, 2006). Um conjunto de *spikes* é uma sequência de impulsos nervosos ou potenciais extracelulares, produzidos por um ou mais neurônios, localizados possivelmente distantes de um microeletrodo, sendo o mesmo conjunto de *spikes* observado por um período de tempo relativamente longo. É importante salientar que o mais importante no sinal são os

spikes porque a informação está contida neles e no atraso consecutivo entre dois deles. Já um *burst* é uma sequência de *spikes* que são separados entre si por tempos muito reduzidos, tipicamente menores que 100 ms (MARQUES et al., 2010).

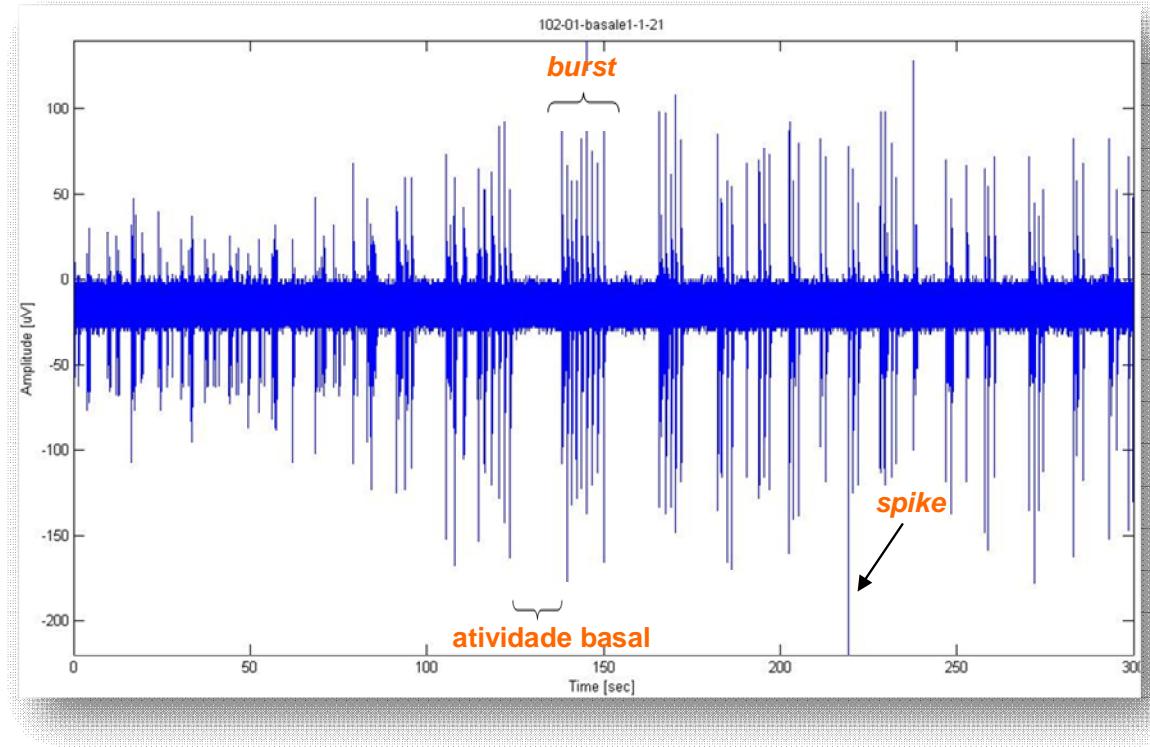


Figura 2.5 - Atividade elétrica típica de um eletrodo da matriz multieletrodo. Escala vertical: amplitude [μ V] e escala horizontal: tempo [s].

Um trem de *spikes* é definido pela equação 2.1:

$$ST(t) = \sum_{s=1}^N \delta(t - t_s) \quad (2.1)$$

onde N é o número de *spikes* detectados na sequência e t_s é o tempo de ocorrência do spike.

Para que um *spike* seja detectado é preciso estabelecer um valor de *threshold* (limiar) que é calculado como múltiplo do desvio padrão, sendo que o último é calculado sobre a atividade basal. Além disso, o valor de limiar padrão adotado é de 7 ou 8.

Utilizando o esquema mostrado na Figura 2.6, é possível detectar um *spike*. Tem-se um sinal elétrico dividido em janelas, sendo que essas janelas deslizam até percorrer todo o sinal. Em cada uma dessas janelas deve conter um simples *spike* e para realizar o armazenamento de *spikes*, deve-se comparar o máximo e o mínimo pico existente dentro de uma janela com o valor de *threshold* calculado. Se o valor do máximo e mínimo pico dentro da janela for maior do que o valor de *threshold*, um *spike* será armazenado.

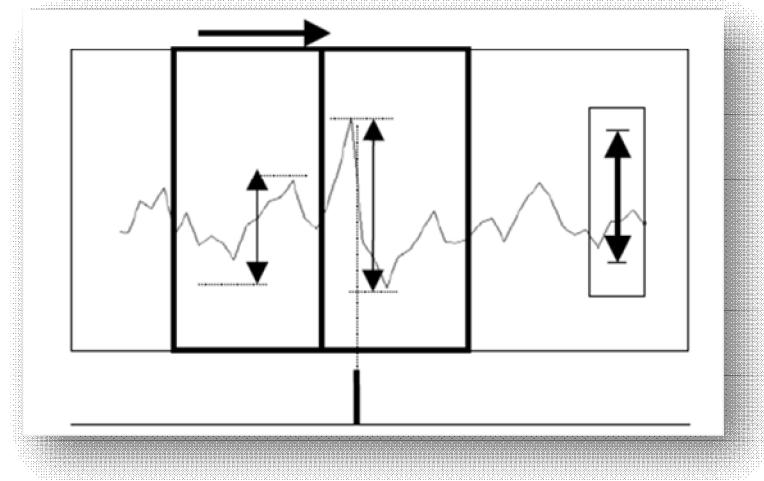


Figura 2. 6 – Detecção de spikes

A partir da análise de *spikes*, é possível conseguir os seguintes parâmetros: número total de *spikes*; quantidade de *spikes* que formam *bursts*; porcentagem de *spikes* randômicos; frequência média de picos em um *burst* (picos/s); e, frequência média de *spikes* em um *burst* (*spikes/s*).

A série de intervalo entre *spikes* (série ISI) é constituída dos instantes de tempo onde houve *spikes*. Esta série se inicia no ponto zero e a cada novo *spike*, o tempo em que ele ocorreu é armazenado, gerando ao final uma série de tempos onde *spikes* foram detectados.

Um *burst* é uma seqüência de *spikes* que ocorrem simultaneamente em diversos canais e possui duração igual a soma de todos os ISI (intervalos entre *spikes*) contidos num mesmo conjunto. Além disso, o valor padrão de *threshold* estabelecido para detecção de *bursts* é de 0,4 *bursts/min*.

Para detecção de um *burst*, deve-se saber que dentro deles, os *spikes* são muito próximos podendo possuir um ISI máximo na ordem de 100 ms. A distância entre *bursts* deve ser de no mínimo 100 ms (IBI, intervalo entre *bursts*, mínimo na ordem de 100 ms). Além disso, um *burst* é formado por certo número de *spikes* (5 a 10 *spikes*).

Um trem de *bursts* é definido pelas equações 2.2

$$BT(t) = \sum_{b=1}^M \left(A_b \Pi \left(\frac{t - t_b - \frac{T_b}{2}}{\frac{T_b}{2}} \right) \right) \quad \text{e} \quad A_b = \frac{1}{T_b} \int_{T_b} \sum_{s=1}^N \delta(t - t_s) dt = \frac{N_{T_b}}{T_b} \quad (2.2)$$

onde M é o número total de *bursts* e T_b é o tempo de ocorrência de um *burst*. Essa equação pode ser exemplificada pela Figura 2.7 que mostra os retângulos brancos como *bursts* e o intervalo entre eles como o IBI. Observe que cada *burst* é constituído de vários *spikes* e o ISI representa o intervalo entre eles.

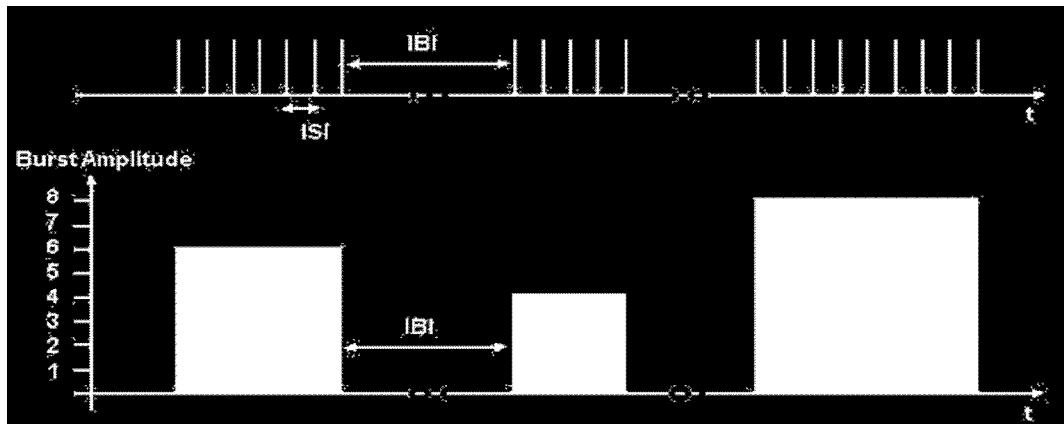


Figura 2.7 – Detecção de bursts

A partir da análise de *bursts*, consegue-se obter: taxa média de *bursts* (*bursts/min*); número total de *bursts*; média de *spikes* por *bursts*; duração dos *bursts* (ms); e, intervalo entre *bursts* (s).

2.4 SOFTWARE SPIKEMANAGER

Estudos relacionados à rede neural não estão interessados em medidas de tensão ou corrente precisas, mas procuram observar potenciais de ação que ocorrem em uma dada área e tempo, pois pesquisadores acreditam que os neurônios se comunicam através dos *spikes* e isso seria uma forma de entender o código neural. Sendo assim, cada *spike* pode ser descrito em um instante de tempo em que ele possui ponto de máximo, fazendo com que ele possa ser facilmente detectado com uma boa precisão.

Para se obter parâmetros relevantes a respeito do código neural, necessita-se de fazer medidas em longo prazo, de minutos a horas ou mais. Devido a isso, são gravados dados na ordem de Gbytes de informações como resultado de um simples experimento e, portanto, o processamento desses dados não seria muito fácil. Para aplicação da técnica clássica de detecção de *spikes* foi desenvolvido um *software* em Matlab® pelo NBT-DIBE (*Neuroengineering and Bio-nanoTechnology Group – NBT, Department of Biophysical and Electronic Engineering – DIBE*) da Universidade de Gênova, denominado *SpikeManager* (VATO et al., 2004). O *software* foi atualizado, adicionando-se a ele funções responsáveis pelo agrupamento dos dados, pela geração de mapas de atividade da taxa média de disparos de *spikes* (MFR – *Mean Firing Rate*), da taxa média de *bursts* (MBR – *Mean Burst Rate*), entre outras funções. Este *software*, portanto, é uma ferramenta para gerenciamento e processamento de sinais em vários canais. O objetivo do *SpikeManager* é permitir uma análise estatística de culturas neurais *in vitro* com uma simples e rápida forma de gerenciamento de uma grande quantidade de dados.

A primeira ferramenta desenvolvida no *SpikeManager* é a detecção de picos que tem função de extrair os eventos de *spikes* a partir dos sinais para várias análises. Vários algoritmos foram desenvolvidos, mas o melhor consiste na criação de um vetor com o mesmo comprimento do vetor de dados no qual é armazenado apenas informação da amplitude e tempo dos *spikes*.

Foram desenvolvidos alguns critérios para detecção de picos. O primeiro deles é a detecção de picos por limiar diferencial. Nesse critério, uma janela que contém um simples *spike* percorre todo o sinal e faz uma comparação até que a diferença entre o máximo e o mínimo

dentro da janela seja maior do que um valor de limiar pico a pico pré definido e, quando isso ocorre, um *spike* é armazenado.

O segundo critério é a detecção de picos com limiar positivo e negativo. Nesse critério, existem dois limiares diferentes. Quando o pico positivo do sinal é maior do que o pico positivo do limiar, o pico negativo do sinal é menor do que o pico negativo do limiar e o atraso entre dois eventos seqüenciais é maior do que o período de refração, um *spike* é armazenado.

Por fim, o último critério apresentado foi detecção de picos por limiar a partir do desvio padrão e possui um funcionamento semelhante ao critério por limiar diferencial. O valor de limiar é computado multiplicando um fator digitado por usuários pelo desvio padrão calculado sobre a atividade basal. Como padrão, utiliza-se um fator de número 7 ou 8. A janela que contém um simples *spike* desliza até que a atividade neural dentro da janela esteja acima do valor de limiar estabelecido. Quando isso ocorre, um *spike* é armazenado.

O intervalo entre *spikes* (ISI) corresponde ao tempo entre dois *spikes* consecutivos. O histograma de intervalo entre *spikes* é construído a partir do agrupamento de vários ISI's. A análise do histograma ISI provê uma estimativa estatística da probabilidade de disparos de *spikes* consecutivos em relação a um *spike* de referência.

A detecção de *bursts* ocorre porque provê uma grande quantidade de informação a respeito da vida coletiva da rede neural. Um *burst* é detectado quando um conjunto de *spikes* é encontrado e a somatória das amplitudes dos *spikes* dentro do conjunto é maior do que um valor de limiar pré-definido. A partir da detecção de *bursts*, consegue-se o tempo de ocorrência de *bursts* em segundos, a duração deles em milissegundos ou segundos, intervalo entre *bursts* (IBI) em milissegundos e a amplitude deles. O IBI, analogamente ao ISI, é definido como o tempo entre um *burst* final e um *burst* seguinte.

Algumas adequações foram feitas no *SpikeManager* para melhor processamento e posterior análise dos resultados. Desenvolveu-se um programa responsável por agrupar as quatro fases de 5 minutos cada em um único arquivo de 20 minutos. Isso foi necessário, pois, ao analisar

as fases separadamente, poderia ocorrer o início de um *burst* no final de uma fase e o final do mesmo *burst* no início da fase seguinte. Caso isso ocorresse, o *software* utilizado para processar os dados entenderia que existem dois *bursts* separados, o que não corresponde à realidade. Nesse sentido, o agrupamento foi feito para que diminuísse possíveis erros que poderiam ser gerados entre o final de uma fase e a fase seguinte.

A partir do *SpikeManager* os sinais podem ser processados e vários quantificadores podem ser obtidos. Entre eles: conversão de dados, detecção de picos, análise de *spikes*, análises de *bursts*, gráficos de Raster Plot, histogramas de intervalos entre *spikes* (ISI – *Inter Spike Interval*), histogramas de intervalos entre *bursts* (IBI – *Inter Burst Interval*), taxas médias de disparo de *spike* (MFR – *Mean Firing Rate*) e de ocorrência de *bursts* (MBR – *Mean Burst Rate*) para cada DIV, além de outras estatísticas observadas a partir desses valores. O primeiro passo para o processamento dos dados eletrofisiológicos é reduzir a incrível quantidade de dados gravados. Os dados são disponíveis em formato binário (cada valor = 2bytes) e podem ser facilmente lidos pelo Matlab.

Para fazer a detecção de picos, o sinal é dividido em janelas de 3 ms e o máximo e o mínimo pico dentro de cada janela é analisado. O *software* cria um vetor de *threshold* denominado *thresh* que é um múltiplo do desvio padrão calculado a partir da atividade basal. Se a diferença entre o máximo e o mínimo pico em cada 3 ms for maior do que o valor de *threshold*, um *spike* é armazenado e posicionado no tempo correspondente ao maior valor entre o máximo e o mínimo analisado, caso contrário, um novo quadro é analisado. Os dados são salvos em um vetor denominado *peak_train* que contém o tempo em que os *spikes* foram armazenados e a amplitude pico a pico deles, necessárias para várias identificações de *bursts*. Além da variável *peak_train*, outra variável armazenada é a *artifact* que contém a ocorrência de estímulos e é claramente identificada, já que é bem maior do que o vetor de *spikes*.

Os dados então foram reduzidos graças ao comando de detecção de picos. Após isso, eles podem ser analisados pelo comando análise de *spikes* ou análise de *bursts*. Para o primeiro caso, o parâmetro que pode ser extraído é a taxa média de disparos (MFR) que corresponde ao número de *spikes* que ocorrem em uma janela com um tempo definido, geralmente um múltiplo de 5 minutos, ou seja, uma fase.

Um *burst* é encontrado a partir do comando de detecção de *bursts*. Uma janela de 200 ms percorre uma variável denominada *buffer* que contém 2000 amostras do vetor criado a partir do comando de detecção de picos (*peak_train*). Se o somatório dos picos dentro da variável *buffer* for maior do que zero, um grupo de *spikes* pode identificar o começo de um *burst*. Além disso, se a amplitude total dos *spikes* dentro de um bloco for superior ao limiar de *burst*, o grupo de *spikes* detectados é considerado como um *burst* e uma variável denominada *burst_train* é criada e atualizada após cada comparação. Um *burst* termina quando o primeiro bloco depois de um bloco constituído de *bursts* não possui nenhum *spike*.

Alguns parâmetros padrões são utilizados no processamento dos dados, conforme apresentados na Tabela 2.1. O valor do limiar estabelecido para detecção de picos é calculado como sendo 8 vezes o desvio padrão de uma janela do sinal dimensionada de modo a não conter picos, (CHIAPPALONE, 2003). A freqüência de amostragem é ajustada a 10.000 amostras por segundo. A detecção de picos é baseada uma janela de 2 milissegundos que desliza ao longo do sinal. É também usado um valor de limiar de artefato de 800 μ V e uma distância mínima de artefato de 0,5 segundos. A taxa média de disparos de *spikes* é calculada considerando um valor mínimo de disparos de 0,1 *spikes* por segundo e uma janela de artefato de 4 ms. Para o cálculo dos histogramas ISI considera-se um bin (tamanho da janela) de 2 ms. A detecção de *bursts* é realizada com um número mínimo de *spikes* dentro de cada *burst* igual a 5, um valor máximo de intervalo entre *spikes* dentro de cada *burst* de 100 ms, um valor limiar para taxa de *bursts* de 0,4 *bursts* por minuto e uma janela de artefato de 4 ms. Já para os histogramas de IBI utiliza-se um bin de 1 segundo. Tais parâmetros são ajustados de acordo com (CHIAPPALONE, 2003).

Para análise de dados, deve-se primeiramente realizar a gravação dos sinais através de um sistema de aquisição de dados. Esses dados são convertidos em formato aceito pelo Matlab (.MAT) e é feito uma detecção de *spikes*. A partir disso, analisam-se os *spikes* e faz-se uma detecção de *bursts*, para posteriormente fazer uma análise de *bursts*. Essas últimas funções são realizadas pelo *SpikeManager*.

Tabela 2. 1 - Parâmetros utilizados no processamento dos dados

Parâmetro	Valor	Unidade
Limiar de detecção de picos	8	vezes o desvio padrão
Frequência de amostragem	10.000	amostras/s
Janela para detecção de picos	2	ms
Limiar de artefato	800	μ V
Distância mínima de artefato	0,5	s
Taxa de disparos de <i>spikes</i>	0,1	<i>spikes/s</i>
Janela de artefato	4	ms
Tamanho da janela (bin ISI)	2	ms
<i>Spikes/burst</i>	5	<i>spikes</i>
Intervalo entre <i>spikes</i> dentro dos <i>bursts</i>	100	ms
Limiar para taxa de <i>bursts</i>	0,4	<i>bursts/min</i>
Janela de artefato	4	ms
Tamanho da janela (bin IBI)	1	s

Alguns menus disponíveis a partir do *SpikeManager* podem ser visualizados a seguir.

MCD – MAT *Converter*

Os dados são gravados em formato .MCD e convertidos para .MAT (formato do Matlab), sendo que cada arquivo contém gravação de cinco minutos dos sessenta canais e na conversão, um arquivo .MCD é convertido em sessenta arquivos .MAT.

Peak Detection

A detecção de picos é feita primeiramente calculando o valor de limiar, mostrado anteriormente. Seleciona-se primeiro o trecho a ser calculado e um vetor de sessenta valores é criado. Após a criação do vetor de *threshold*, é feito uma comparação entre esse vetor e o sinal gravado. A partir disso, outros vetores são armazenados com os valores de trens de picos detectados.

Raw Data and Peaks

O *SpikeManager* realiza gráficos dos sinais gravados com os seus respectivos picos e *spikes*, sendo os últimos representados pelos pontos vermelhos na Figura 2.8. Observa-se que todo *spike* é pico, mas nem todo pico é *spike*.

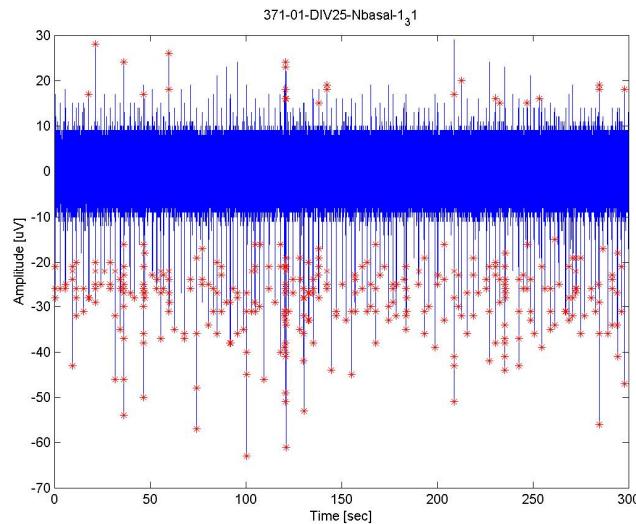


Figura 2. 8 - Sinal de um microeletrodo da MEA com os respectivos *spikes* identificados pelos pontos vermelhos

Expoente Alfa

A Figura 2.9 mostra os valores do Expoente Alfa (curva em azul) para cada DIV. As barras pretas acima e abaixo da curva azul representam o desvio-padrão do quantificador estudado. O eixo y representa o valor médio do Expoente de Alfa para todos os 60 canais da MEA e o eixo x representa o DIV que está sendo analisado.

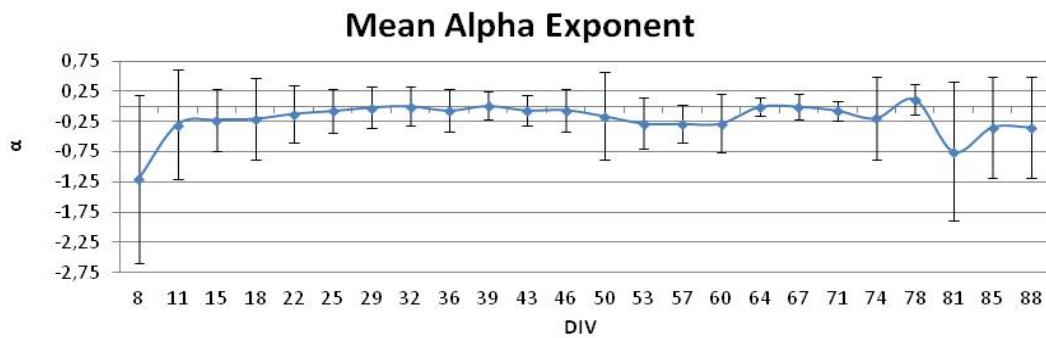


Figura 2. 9 - Expoente de Alfa médio para os DIV's 08 à 88.

Expoente de Hurst

Analogamente ao gráfico do Expoente de Alfa, temos a Figura 2.10 que representa o valor médio do Expoente de Hurst para cada DIV com o respectivo desvio-padrão. O eixo y representa o valor médio do Expoente de Hurst para todos os 60 canais da MEA e o eixo x representa o DIV que está sendo analisado.

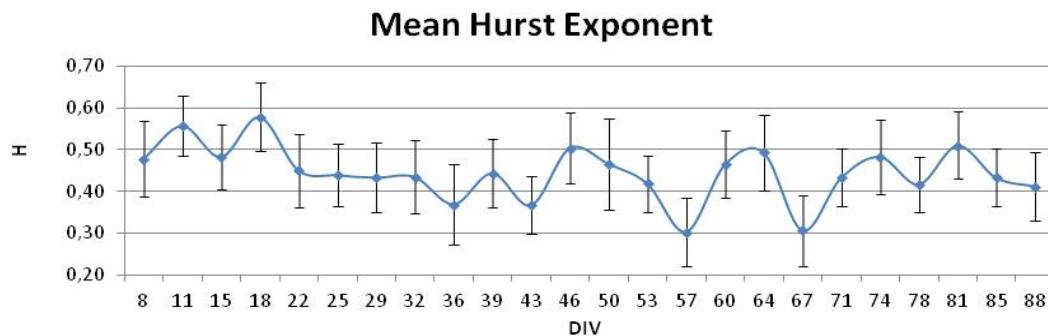


Figura 2. 10 - Expoente de Hurst médio para os DIV's 08 à 88.

Atividade elétrica espontânea

A Figura 2.11 é um gráfico que mostra a evolução da atividade elétrica espontânea do canal 83 do experimento 364. O eixo x representa o tempo em segundos e o eixo y representa a amplitude em μ V.

Raster Plot

O próximo gráfico apresentado é o *Raster Plot* que mostra o comportamento do sinal de cada eletrodo ao longo do tempo, em relação ao disparo de *spikes*. Neste gráfico representado pela Figura 2.12 cada número na vertical (eixo y) representa os eletrodos ou canais da cultura, e na horizontal (eixo x) tem-se o tempo em segundos. Para cada eletrodo pode ser vista a quantidade de *spikes* detectados durante os 20 minutos (ou 1200 segundos) de experimento. O objetivo desses gráficos é possibilitar uma rápida visualização geral do estado de ativação elétrica do tecido analisado, considerando os 60 microeletrodos ao mesmo tempo, e não informações detalhadas de cada microeletrodo.

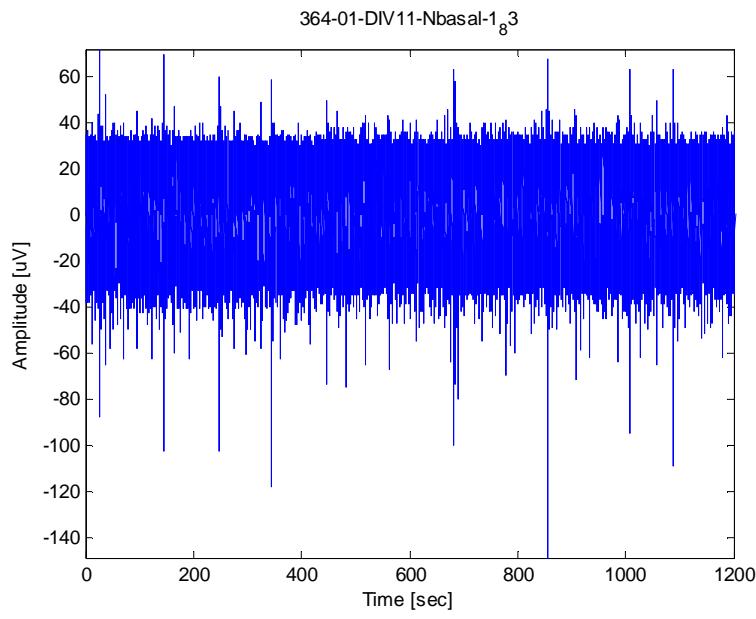


Figura 2. 11 - Gráfico de atividade elétrica do experimento 364, canal 83, DIV11

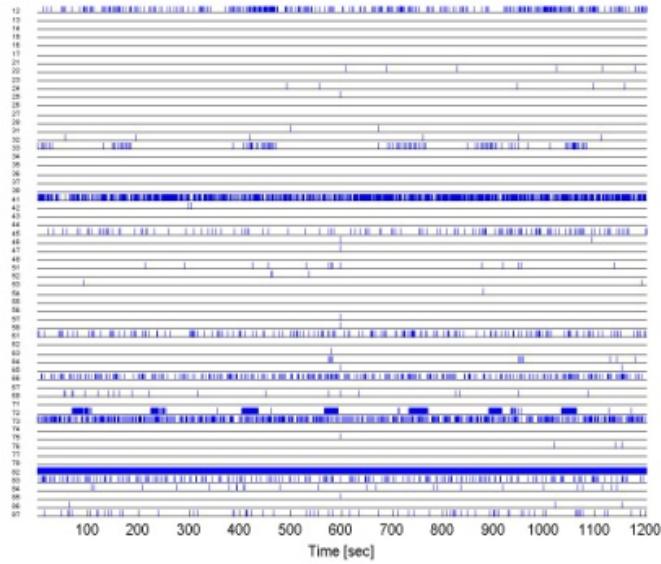


Figura 2. 12 - Gráfico de Raster Plot do experimento 364, DIV 08

Intervalo entre *Spikes*

O gráfico apresentado na Figura 2.13 mostra os valores de ISI (*Inter Spike Interval* - intervalo entre *spikes*) calculados a partir do vetor de trem de *spikes* fornecidos pelo *software*

SpikeManager. O eixo y mostra o intervalo entre *spikes* em milissegundos e o eixo x mostra o dia *in vitro*. Para cada DIV, tem-se uma média dos valores de ISI dos 60 canais da MEA. As variações mostradas em cada DIV representadas pelas barras verticais acima dos valores de ISI representam o desvio-padrão do ISI para o respectivo DIV.

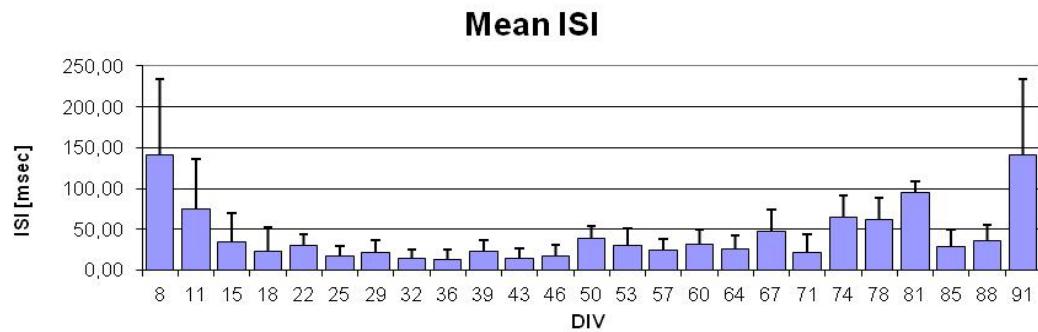


Figura 2. 13 - Intervalo entre *spikes* (ISI) médio para cada cultura ao longo do tempo.

Intervalo entre *Bursts*

Analogamente ao que foi apresentado na Figura 2.13, a Figura 2.14 mostra valores médios de intervalos entre *bursts* (IBI). Para cada DIV, tem-se uma média dos valores de IBI dos 60 canais da MEA. As variações mostradas em cada DIV representadas pelas barras verticais acima dos valores de IBI representam o desvio-padrão do IBI para o respectivo DIV.

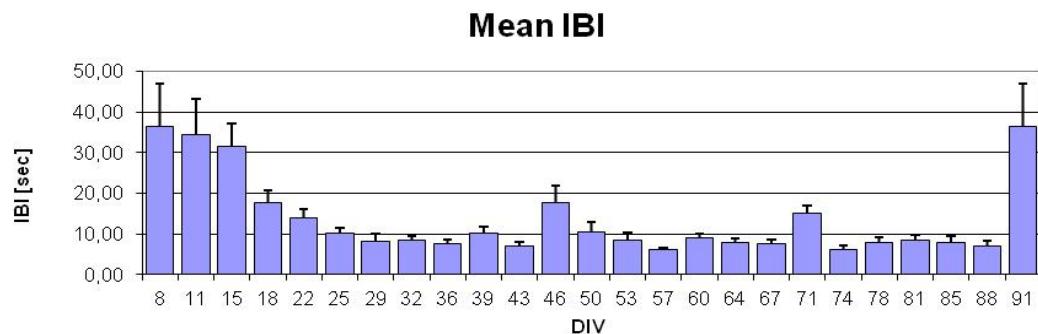


Figura 2. 14 - Intervalo entre *bursts* (IBI) médio para cada cultura ao longo do tempo.

Region Color ISI e SD Region Color ISI

Apresenta-se também os valores médios de intervalo entre *spikes* por canal em cada DIV por experimento, obtendo-se uma figura similar à Figura 2.15. Já na Figura 2.16, observa-se o desvio-padrão do intervalo entre *spikes*. Cada quadrado mostrado representa a localização espacial de um eletrodo da MEA, supondo-se visão superior do dispositivo. Assim, na Figura 2.15, tem-se informação mais detalhada acerca do comportamento médio da atividade elétrica, em termos do ISI, para cada eletrodo, ao longo do tempo. Além disso, deve-se notar que nesta mesma figura os eixos x e y correspondem à localização espacial dos microeletrodos e, portanto, a informação central está concentrada na magnitude do ISI médio, ou seja, na cor de cada quadrado. Ao analisar a Figura 2.15, percebem-se cores diferentes para determinados eletrodos. Do lado direito de cada figura, é possível visualizar uma escala de cores, desde 0 (zero), que é representado pela cor azul-escura, até 500 que é representado pela cor vermelho-escura. Assim, cada cor das Figuras 2.15 a 2.18 representará um respectivo valor de acordo com a escala de cores posicionada no lado direito de cada figura.

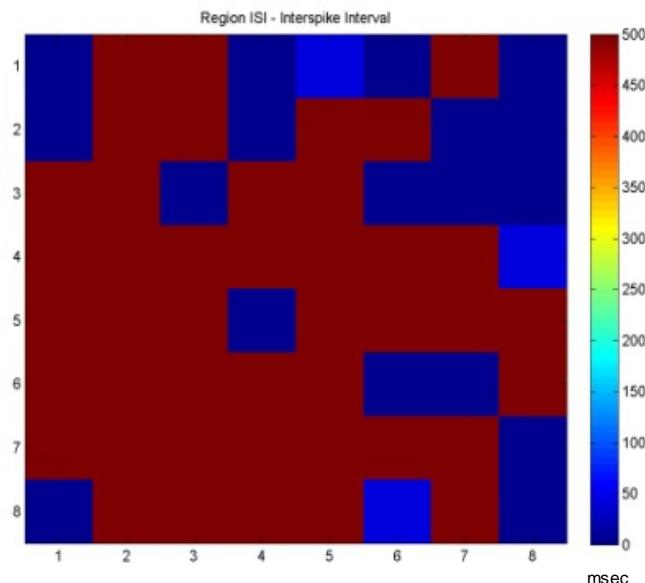


Figura 2. 15 - Intervalo entre *spikes* por região para o experimento 364, DIV 08

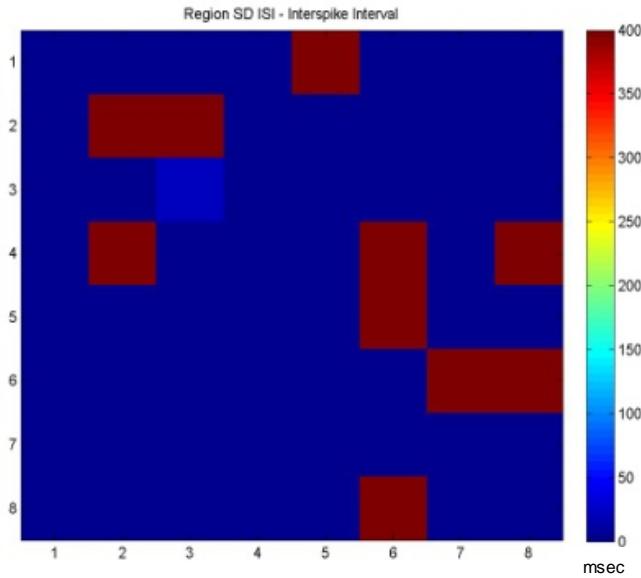


Figura 2. 16 - Desvio-padrão do intervalo entre *spikes* por região para o experimento 364, DIV 08

Region Color IBI e SD Region Color IBI

Analogamente ao que foi mostrado para o ISI, mostraremos para o IBI (Intervalo entre *Bursts*). A Figura 2.17 apresenta os valores médios do intervalo entre *bursts* por canal para o experimento 364. Já na Figura 2.18 é possível visualizar o desvio-padrão do intervalo entre *bursts* para o experimento 364. Assim sendo, na Figura 2.17, tem-se informação mais detalhada acerca do comportamento médio da atividade elétrica, em termos do IBI, para cada eletrodo, que pode ser associado a certo quadrado da figura, ao longo do tempo. Além disso, deve-se notar que nessa mesma figura os eixos x e y correspondem à localização espacial dos microeletrodos e, portanto, a informação central está concentrada na magnitude do IBI médio, ou seja, na cor de cada quadrado.

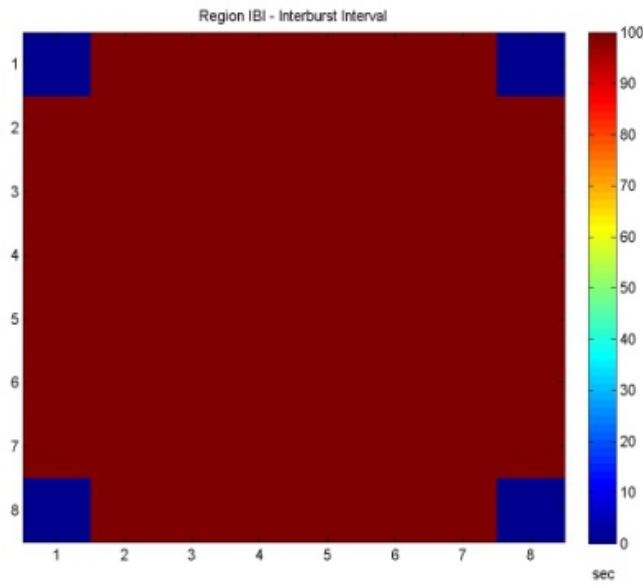


Figura 2. 17 - Intervalo entre *bursts* por região para o experimento 364, DIV 08

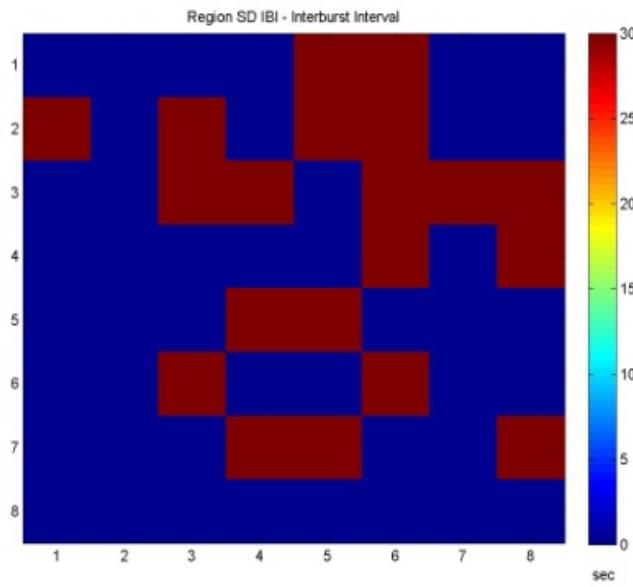


Figura 2. 18 - Desvio-padrão do intervalo entre *bursts* por região para o experimento 364, DIV 18

Número de canais com ruído, *spikes* e *bursts*

Outro quantificador utilizado no processamento dos sinais registrados a partir das matrizes multieletrodo foi relativo à quantidade de canais que possuem apenas ruído, apenas *spikes* e apenas *spikes* e *bursts*. Este quantificador é apresentado pela Figura 2.19, onde o eixo y

representa a quantidade de canais e o eixo x representa os DIVs. Observa-se em tonalidade mais forte a quantidade de canais que possuem *bursts*. A quantidade de canais que possuem *spikes* é apresentada em tonalidade média, da qual a quantidade de canais que possuem *bursts* (tonalidade forte) faz parte. Por fim, a quantidade de canais que possuem apenas ruído, seja de instrumentação ou biológico, é apresentada na tonalidade mais clara.

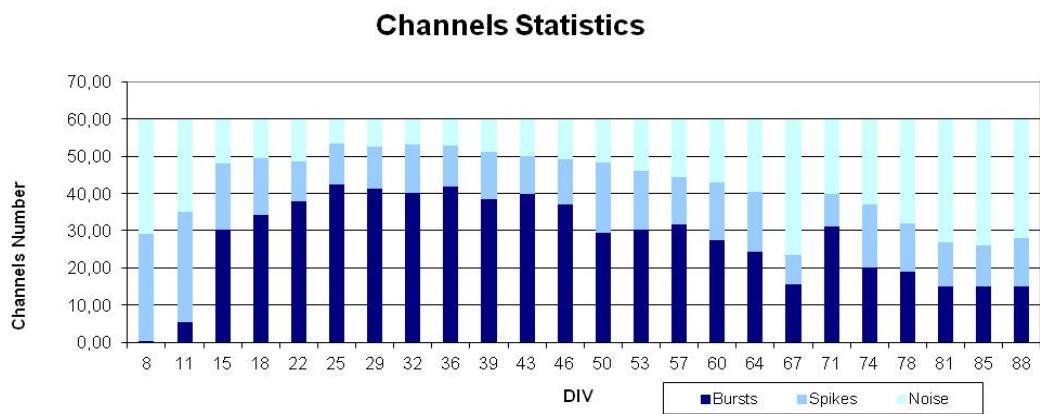


Figura 2.19 - Número de canais que possuem apenas ruído e apenas *spikes* e/ou *bursts* ao longo do tempo.

Histogramas de intervalos entre *spikes* (ISI)

Os histogramas de ISI (*Inter Spike Interval*) estimam a probabilidade de um determinado intervalo entre *spikes* ocorrer em certo tempo. Os histogramas ISI por DIVs são representados pela Figura 2.20, com intervalo de 0 a 50 ms, que corresponde a uma faixa em que a atividade de *spikes* é melhor observada.

Histogramas de intervalos entre *bursts* (IBI)

Os histogramas de IBI (*Inter Burst Interval*), analogamente aos histogramas ISI, mostram a probabilidade do intervalo entre *bursts* ocorrer também em um determinado tempo. A Figura 2.21 exibe os histogramas IBI para cada DIV, nos quais o intervalo entre *bursts* foi tomado de 0 a 20 segundos, devido à maior densidade de IBIs nessa faixa.

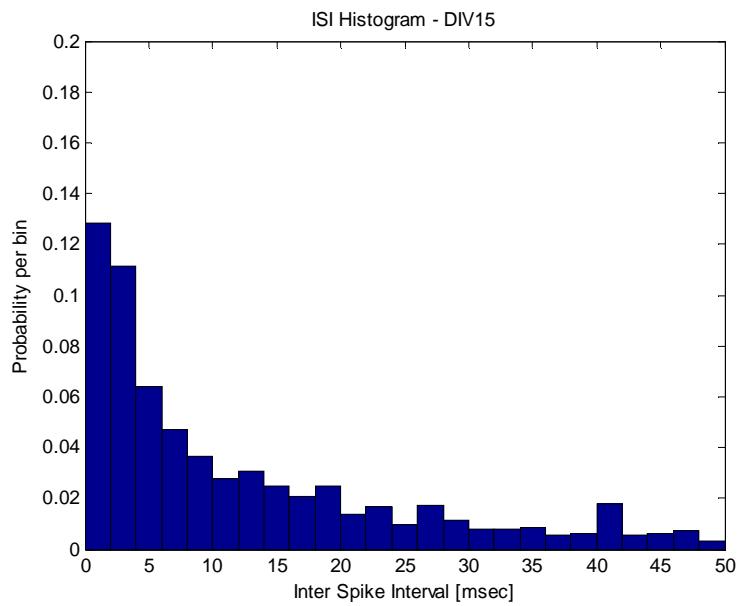


Figura 2. 20 - Histograma de intervalos entre *spikes*.

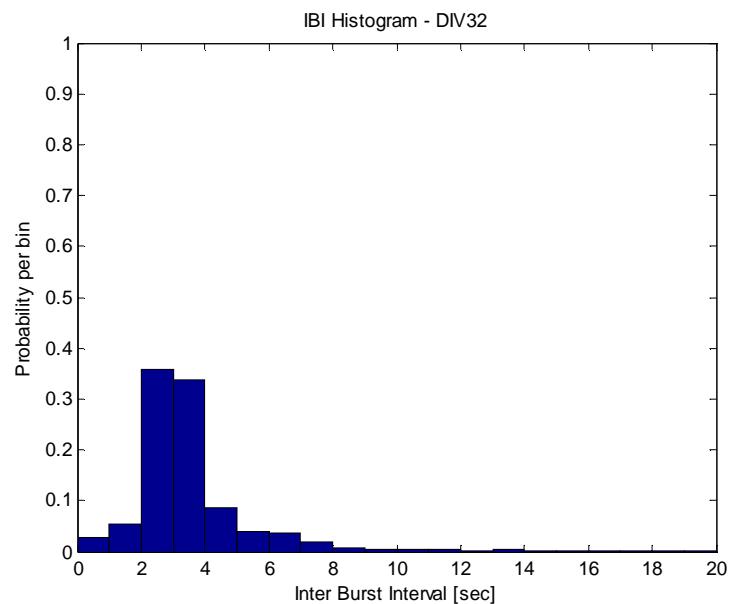


Figura 2. 21 - Histograma de intervalos entre *bursts*.

Estatísticas

Apresenta-se, por fim, as estatísticas dos experimentos processados, conforme Figuras 2.22-2.27. É possível realizar uma comparação em relação aos *spikes* e em relação aos *bursts* dos experimentos analisados neste trabalho.

A Figura 2.22 apresenta o número total de *spikes* médio para cada DIV analisado. O eixo y representa o valor total médio de *spikes* e o eixo x representa o respectivo DIV. A Figura 2.23 apresenta o número médio de *spikes* que formam *bursts* em cada DIV. O eixo x representa o DIV analisado e o eixo y representa a quantidade média de *spikes* que constituem *bursts* no DIV em questão.

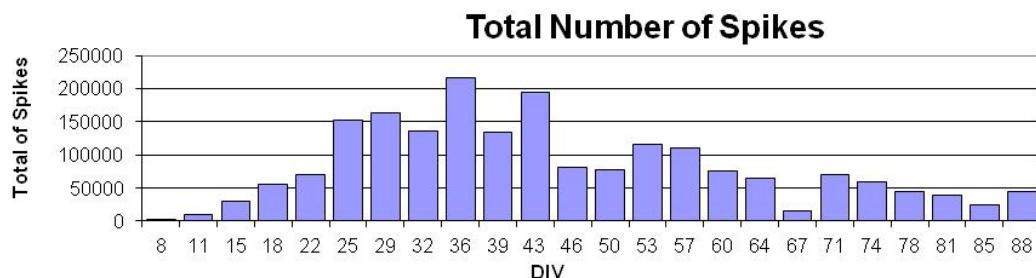


Figura 2. 22 - Número total de *spikes* para cada DIV.

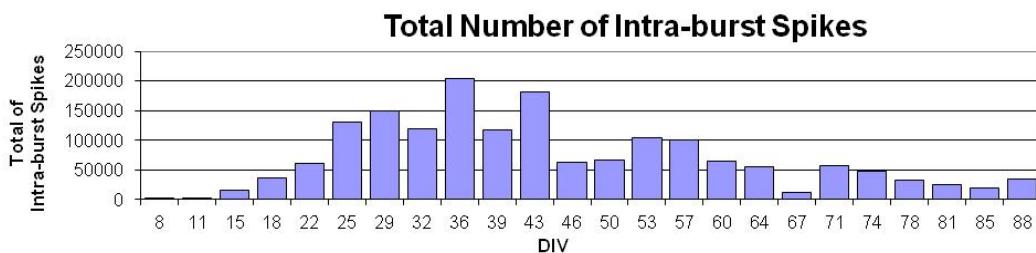


Figura 2. 23 - Número médio de *spikes* que formam *bursts* em cada DIV.

A Figura 2.24 representa a porcentagem de *spikes* aleatórios para cada DIV, sendo o eixo x o DIV e o eixo y a porcentagem de *spikes* randômicos. Já a Figura 2.25 apresenta o número total de *bursts* para cada DIV. O eixo x representa o DIV e o eixo y representa o número médio de *bursts* para todos os experimentos.

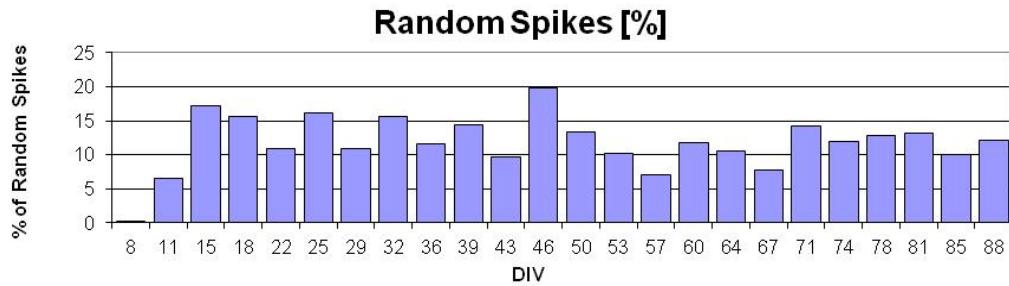


Figura 2. 24 - Porcentagem de *spikes* aleatórios em cada DIV.

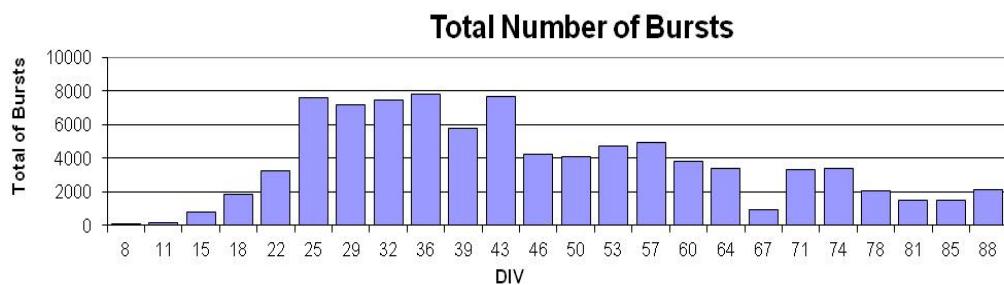


Figura 2. 25 - Número total de *bursts* em cada DIV.

A Figura 2.26 apresenta o número médio de *spikes* por *bursts* em cada DIV. Por fim, analisando o último resultado estatístico extraído do processamento pelo *SpikeManager* apresentado na Figura 2.27, que representa a duração média dos *bursts* dada em milissegundos em cada DIV, observa-se que o comportamento deste quantificador é similar ao quantificador de quantidade de *spikes* por *bursts* apresentado anteriormente.

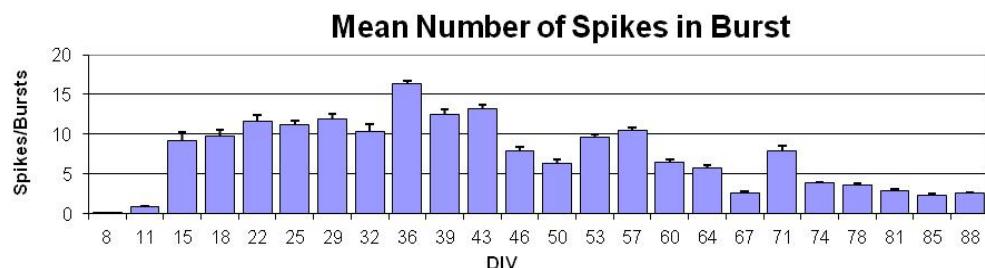


Figura 2. 26 - Número médio de *spikes* por *burst* em cada DIV.

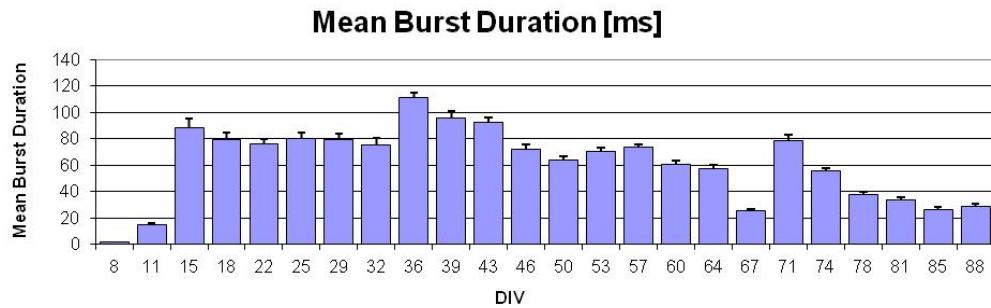


Figura 2. 27 - Duração média dos *bursts* em cada DIV.

Nos próximos capítulos serão apresentados processamentos utilizando o *software SpikeManager* e outras ferramentas matemáticas para processamento e posterior análise dos resultados.

2.5 CRESCIMENTO DA CULTURA

Diversos artigos da literatura se dedicam ao estudo do processo de conexão funcional entre as células e os microeletrodos, o que possibilita também a compreensão acerca da formação de redes neurais biológicas (CHIAPPALONE, 2006; CHIAPPALONE, 2007; KAMIOKA, 1996; TATENO, 2002; VAN PELT, 2004; VAN PELT, 2005). Esses artigos se valem da análise da atividade espontânea, registrada através de MEAs. A Tabela 2.2 a seguir resume as principais características dos estudos que podem ser considerados mais importantes.

Uma observação importante é que a quantidade de culturas medidas apresentadas na Tabela 2.2 se refere apenas ao total de culturas efetivamente monitorado ao longo do máximo período de duração do estudo. Com base nos resultados obtidos pelos artigos associados a esta tabela, o texto a seguir e a Tabela 2.3 sintetizam os principais fenômenos observados e respectivas interpretações fisiológicas.

2.5.1 Etapa 1: Dia *In vitro* (DIV) 1 – DIV7 (1^a Semana *In vitro* - SIV)

Caracterizada por uma pequena quantidade de *spikes* aleatórios, presentes em quase todos os canais; a microscopia eletrônica revela tipos imaturos de sinapses e densidade sináptica muito baixa. Isto explica a quase inexistência de *bursts*, como uma consequência do padrão da densidade sináptica, predominando conexões próximas, do tipo junção gap (CHIAPPALONE, 2006). Desta forma, os neurônios podem ser considerados isolados (VAN PELT, 2005).

2.5.2 Etapa 2: DIV8 – DIV14 (2^a SIV)

Caracterizada por uma pequena quantidade de *bursts* de longa duração, podendo atingir até um segundo conforme (VAN PELT, 2004). Estão presentes inicialmente em alguns canais e, à medida que o tempo passa, expandem-se para quase todos os microeletrodos. O aumento expressivo da sinaptogênese química leva o estabelecimento de uma grande quantidade de conexões distantes, processo este mediado provavelmente pelas vias glutamatérgicas e/ou pelos receptores AMPA, tal que a taxa média de disparos atinge o valor de 1,4 *spikes/s* em DIV14 (CHIAPPALONE, 2006). Para este último dia, ocorre um pico na quantidade de *spikes* presentes em um *burst* e o tempo médio de duração dos *bursts* alcança seu máximo

(CHIAPPALONE, 2006). O mecanismo de inibição sináptica está pouco desenvolvido, sendo que a rede de conexões pode ainda ser considerada imatura (VAN PELT, 2004).

2.5.3 Etapa 3: DIV15 – DIV28 (3^a e 4^a SIV)

Caracterizada por uma grande quantidade de *bursts* de curta duração, atingindo valores mínimos de até 30 ms, segundo (VAN PELT, 2004; VAN PELT, 2005), com padrões repetitivos periódicos, presentes em quase todos os canais, revelando um grande sincronismo e uma grande variabilidade no processo de geração dos *bursts*. Há um expressivo crescimento das conexões sinápticas próximas e decréscimo das conexões distantes, confirmado por microscopia eletrônica. Entre o DIV15 e o DIV20, (TATENO, 2002) apresenta evidências experimentais da forte atuação de receptores antagonistas do tipo receptor GABA sobre as células. Além disso, (KAMIOKA, 1996) sugere que o influxo de íon cálcio associado aos intensos *bursts*, durante esta etapa, pode disparar mecanismos de sinalização celular responsáveis pelo desenvolvimento de sinapses. Observa-se a completa maturação das conexões excitatórias, fato este provavelmente causado pela ação do receptor NMDA, tal que a taxa média de disparos atinge o valor de 2,2 *spikes/s* em DIV21, observando-se também o pico da taxa média de *bursts* (CHIAPPALONE, 2006; KAMIOKA, 1996). A partir do DIV 22 (4^a SIV), inicia-se a redução das sinapses nos dendritos, levando ao equilíbrio entre excitação e inibição, acarretando diminuição no tempo médio entre *bursts* (VAN PELT, 2004).

2.5.4 Etapa 4: DIV29 – DIV35 (5^a SIV)

Caracterizada por uma grande quantidade de *spikes* aleatórios, porém altamente sincronizados (KAMIOKA, 1996), presentes em quase todos os canais, consequência do declínio transitório no número de sinapses. Tal comportamento da densidade sináptica é confirmado por microscopia eletrônica. As taxas médias de disparos atingem os valores de 1,7 *spikes/s* e 1,3 *spikes/s* em, respectivamente, DIV28 e DIV35; ao passo que o padrão de *bursts* da rede é bastante estável, sem grandes alterações, revelando que o padrão de conectividade sináptica atingiu a maturidade ou a estabilização. Assim sendo, a cultura estaria mais propícia a apresentar formas rudimentares de “aprendizado ou de memória”, ou ainda ser influenciada por estímulos externos “sensoriais” (CHIAPPALONE, 2006; VAN PELT, 2005). Além disso, particularmente para o 30º DIV observou-se que o histograma de intervalo entre *bursts*

assume um formato próximo a uma distribuição de Poisson (TATENO, 2002), sendo que a duração média destes é da ordem de 300 milissegundos (KAMIOKA, 1996).

As quatro etapas acima discutidas devem ser confrontadas com o artigo (MOODY, 2005), que discute o papel da atividade neural espontânea, assunto principal da presente dissertação e base experimental de todos os trabalhos acima discutidos. No processo de crescimento celular, os neurônios exibem características de estabilidade e plasticidade nos seus padrões de atividade: a primeira por terem a capacidade de manter sua atividade espontânea constante e a segunda por conseguirem fazer uma transição bem sucedida dos estados de atividade espontânea (etapas 1 e 2 supracitadas, em que tanto *spikes* como *bursts* são aleatórios) para aqueles de disparos padronizados (etapas 3 e 4 supracitadas, em que tanto *spikes* como *bursts* são sincronizados). Durante a transição (etapa 3), ocorre igualmente o desenvolvimento dos canais iônicos voltagem-dependente, os quais também possuem papel fundamental no processo de crescimento das células; isso tudo em contraste com as junções gap desenvolvidas durante a etapa 1.

Ainda com base em (MOODY, 2005), a atividade elétrica dos neurônios durante seu processo de crescimento regula a expressão de uma grande diversidade de canais Ca^{2+} , voltagem e ligando dependente. A regulação dos canais iônicos voltagem-dependente por atividades elétricas das células pode inclusive controlar a distribuição espacial desses canais. Por outro lado, o surgimento desses canais em nervos em desenvolvimento e músculos, ajuda a regular a transição entre os estados imaturos (etapas 1 e 2) e maduros (etapa 4) das células, seja compensando a atividade elétrica excessiva durante o processo (vide etapa 3), ou monitorando o momento exato de eliminar a atividade espontânea para uma transição bem sucedida. Deve-se ressaltar que tais comentários são bastante coerentes com aqueles apresentados em (KAMIOKA, 1996).

Tabela 2. 2 - Síntese das principais características dos estudos da literatura dedicados à análise da maturação de culturas neurais, baseados em registros de atividade elétrica espontânea

Artigo	Tipo de Cultura (Animal)	Detalhes no Preparo da Cultura	Quantidade de Culturas Medidas (Qc) e Tempo de Registro por Experimento (T) [horas]	Quantidade de Dias <i>in vitro</i> Medidos (Qd): Quais Dias Foram Medidos	Quantidade Total de Experimentos Avaliados (Qt) Qt = Qc * Qd * T [horas]	Tipo de MEA Utilizada	Detalhes do Processamento de Sinais
(KAMIOKA, 1996)	Côrtex de embriões de 17 dias, ratas (espécie não especificada)	Não especificado	Não especificados	Qd = 45: não especificou quais dias foram medidos	Qt = 45 Supondo 1 cultura e 1 hora de registro	Não especificado	Não especificado
(TATENO, 2002)	Côrtex de embriões de 18 dias, ratas Wistar	Não especificado	Qc = 44; T = 7 (em média)	Qd = 63: DIV 3 – DIV 65	Qt = 19404	MEA planar de 64 canais; distância entre eletrodos: 180 mm	Focalizada em <i>bursts</i>
(VAN PELT, 2004)	Dissociada, córtex de embriões de 18 dias, ratas Wistar	Cultivados em 2 ml de meio condicionado de glia (GCM)	Qc = 5; T = 1	Qd = 49: todos os dias	Qt = 245	Placas MEA de 60 canais; diâmetro dos eletrodos: 20 µm	Frequência de amostragem de 22,2 kHz
(VAN PELT, 2005)	Dissociada, córtex de embriões de 18 dias, ratas Wistar	Cultivados em 2 ml de meio condicionado de glia (GCM)	Qc = 5; T = 1	Qd = 49: DIV 1 – DIV 49	Qt = 245	MEA hexagonal; diâmetro dos eletrodos: 10 µm	Considera “ <i>bursts</i> da rede”
(CHIAPPALONE, 2006)	Dissociada, córtex de embriões de 18 dias, ratas Sprague-Dawley	Não usou substâncias antimotóticas para impedir crescimento de glia	Qc = 10; T = 20 min	Qd = 5: DIV 7, 14, 21, 28, 35.	Qt = 17	MEA planar de 60 canais; distância entre eletrodos: 200 mm e diâmetro: 10 mm	Não especificado

Tabela 2. 3 - Síntese dos principais fenômenos e interpretações ligadas às diversas etapas do processo de maturação de culturas neurais, com base em (CHIAPPALONE, 2006; KAMIOKA, 1996; TATENO, 2002; VAN PELT, 2004; VAN PELT, 2005; MOODY, 2005).

Etapa, Respectiva Denominação e Duração	Spikes	Bursts	Padrão de Conexão Sináptica (Microscopia Eletrônica)	Canais Iônicos e/ou Eventos Associados, Neurotransmissores.	Conectividade	Atividade Espontânea
DIV01–DIV07 (1ª SIV)	Poucos e aleatórios, em quase todos os canais	Praticamente inexistentes	Baixa densidade, imatura, próxima	Junções gap	Neurônios isolados	Presente (<i>spikes</i> aleatórios)
DIV08–DIV14 (2ª SIV)	DIV14: taxa média de disparo 1,4 <i>spikes/s</i>	Pequena quantidade, longa duração (pico) ao final. Presentes em quase todos os canais e com máxima quantidade de <i>spikes</i>	Alta densidade, imatura, distante	Mediação por vias glutamatérgicas e/ou pelos receptores AMPA; inibição pouco desenvolvida	Neurônios em tentativa de conexão	Presente (<i>bursts</i> aleatórios)
DIV15–DIV28 (3ª a 4ª SIV)	Pico MFR = 2,2 <i>spikes/s</i> (DIV21)	Grande quantidade, pequena duração (30 ms), elevado sincronismo em todos os canais. Pico da taxa média de <i>bursts</i> no DIV 21	Expressivo crescimento das conexões próximas e decréscimo das distantes. Aproximando-se da maturidade	Conexões excitatórias maduras, mediadas por NMDA; atuação do GABA e dos canais de cálcio para o desenvolvimento de sinapses (DIV15–DIV22). Surgimento do mecanismo de inibição, que progressivamente equilibra a excitação (DIV 22). Canais voltagem-dependentes	Rede neural estabelecida	Atividade em processo de estruturação (<i>bursts</i> sincronizados)
DIV29–DIV35 (5ª SIV)	Grande quantidade, aleatórios, sincronizados, em todos os canais. MFR = 1,7 <i>spikes/s</i> para DIV 28	Padrão estável. DIV30: histograma IBI próximo a Poisson; IBI = 300 ms	Declínio das sinapses maduras	Não especificado	Estabilização da rede neural: cultura propícia a “aprendizado /memória” ou a estímulos externos	Atividade estruturada (<i>spikes</i> sincronizados)

Em síntese, o processo de maturação de redes biológicas *in vitro* é caracterizado por duas fases principais (CHIAPPALONE, 2006):

(F1) Modulação e formação na conectividade sináptica (DIV1 – DIV14): desenvolvimento inicial.

(F2) Maturação da conectividade sináptica (DIV22 – DIV33): desenvolvimento tardio.

Observa-se ainda uma interessante correlação entre quantidade de sinapses e duração/sincronismo de *bursts*. Quando há uma densidade elevada de conexões, os *bursts* apresentam duração prolongada, sendo bastante sincronizados; e vice-versa (VAN PEELT, 2005). De fato, (KAMIOKA, 1996) sugere que o influxo de íon cálcio associado aos *bursts*, pode levar à intensificação das conexões e da complexidade da rede biológica em conformidade com a Lei de Hebb (RUTTEN, 2002; VAN PEELT, 2004): quando as membranas pré- e pós-sinápticas são ativadas simultaneamente, a sinapse é reforçada e estabilizada. Além disso, (CHIAPPALONE, 2007) demonstra experimentalmente como o padrão de sincronismo entre *bursts* ou *spikes* é altamente elevado para culturas maduras, podendo ser alterado por estimulações externas. Em síntese, grandes flutuações nas taxas de disparo ou de *bursts* podem realmente ocorrer durante o tempo de crescimento neurítico (VAN PEELT, 2004), podendo ser associadas a outros eventos morfológicos e/ou fisiológicos, conforme discutido logo acima.

2.6 REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. Fundamentos da biologia celular. Porto Alegre: Artmed, 2006. 866 p.

CHIAPPALONE, M.. Acquisition and Processing of Electrophysiological Signals: a New Perspective towards Brain-Machine Interface. Italy (Tesi di Dottorato) – University of Genova, 2003. 232 p.

CHIAPPALONE, M; BOVE, M, VATO, A.; TEDESCO, M. B, MARTIONIA, S.. Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during *in vitro* development. Brain Research , vol. 1093, Issue 1, pp. 41-53, June 2006.

CHIAPPALONE, M; VATO, A.; BERDONDINI, L.; KOUDELKA-HEP, M.; MARTIONIA, S.. Network dynamics and synchronous acitivity in cultured cortical neurons. International Journal of Neural Systems, vol. 17, no. 2, pp. 87 - 103, 2007.

CHIAPPALONE, M; VATO, A.; TEDESCO, M. B.; MARCOLI, M.; DAVIDE, F.; MARTIONIA, S.. Networks of neural coupled to microelectrode arrays: a neural sensory system for pharmacological applications. Biosensors and Bioelectronics. v. 18, p. 627-634, May 2003.

CLAVEROL-TINTURÉ, E.; GHIRARDI, M.; FIUMARA, F.; ROSELL, X.; CABESTANY, J. Multielectrode arrays with elastomeric microstructured overlays for extracellular recordings from patterned neurons. Journal Of Neural Engineering, vol. 2, p. L1-L7, 2005.

COCKERELL, O.C.; SANDER, J.W.A.S. O Custo Econômico da Epilepsia. In: COSTA, J.C. da et al. (ed). Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias. São Paulo: Lemos-Editorial, 1998. p. 21-30.

COOPER, G.M.; HAUSMAN, R.E. A célula - uma abordagem molecular. Porto Alegre: Artmed, 2007. 736 p.

FREEMAN, W. J. Neurodynamics: An Exploration in Mesoscopic Brain Dynamics. Londres: Springer, 2000. 408 p.

FROMHERZ, P. Semiconductor chips with ion channels, nerve cells and brain. *Physica*, vol. 16, p. 24-34, 2003.

GRISCOM, L.; DEGENAAR, P.; LEPIOUFLE, B.; TAMIYA, E.; HIROYUKI, F. Techniques for patterning and guidance of primary culture neurons on micro-electrode arrays. *Sensors and Actuators B*, vol. 83, p. 15-21, 2002.

KAMIOKA, H. et al. Spontaneous periodic synchronized *bursting* during formation of mature patterns of connections in cortical cultures. *Neuroscience Letters*, 206: pp. 109-112, 1996.

LAKARD, S.; HERLEM, G.; VALLES-VILLAREAL; MICHEL, G.; PROPPER, A.; GHARBI, T.; FAHYS, B. Culture of neural cells on polymers coated surfaces for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, p. 1946-1954, 2005.

LITT, M.D'ALESSANDRO B. et al. Translating seizure detection, prediction and brain stimulation into implantable devices for epilepsy. Proc. 1st Int. IEEE EMBS Conf. on Neural Engineering, Capri Island, Italy, 2003, p. 485-492.

MARQUES, S. M.; GUZO, M. G.; NEVES, A. F.; OLIVEIRA, M. M.; MACEDO, D. R.; DESTRO-FILHO, J. B., MURTA-JUNIOR, L. O. "Análise da evolução da atividade elétrica espontânea ao longo da maturação de culturas neurais e correlações fisiológicas". *Revista Horizonte Científico*, 2009, ISSN: 1808-3064. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Uberlândia.

MERCER, H.D.; WHITE, R.L. Photolithographic fabrication and physiological performance of microelectrode arrays for neural stimulation. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 25, n. 6, p. 494-500, November 1978.

MOODY, W.J.; BOSMA, M.M. Ion Channel Development, Spontaneous Activity, and Activity-Dependent Development in Nerve and Muscle Cells. *Physiological Reviews*, n. 85, p. 883–941, 2005.

MULTI CHANNEL SYSTEMS. Microelectrode Array (MEA) - User Manual. Germany, 2005, 54p. Disponível: <http://www.multichannelsystems.com/fileadmin/user_upload/Manuals/MEA_Manual.pdf>

NOVELINO, A.; CHIAPPALONE, M.; VATO, A.; BOVE, M.; TEDESCO, M.B.; MARTIONIA, S. Behaviors from an electrically stimulated spinal cord neuronal network cultured on microelectrode arrays. *Neurocomputing*, vol. 52, p. 661-669, 2003.

POTTER, S. M. “Distributed processing in cultured neuronal networks”, in M.A.L. NICOLELIS (ed.) - *Progress in Brain Research*, vol. 130, p. 49-62, 2001.

POTTER, S.M; DE-MARSE, T.B. A new approach to neural cell culture for long-term studies. *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 110, p. 17-24, 2001.

RIKE, F. et al. *Spikes: exploring the neural code*. N.Y.: The MIT Press, 1997, 234 p.

RUTTEN, W.L.C. et al. Neuroelectronic interfacing with cultured multielectrode arrays toward a culture probe. *Proceeding of the IEEE*, vol. 89, p. 1013-1029, 2001.

RUTTEN, W. L. C. Selective electrical interfaces with the nervous system. *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 4, p. 407-452, 2002.

SPORNS, O.; CHIALVO, D. R.; et al. Organization, development and function of complex brain networks. *TRENDS in Cognitive Sciences*, v.8, n.9, p.418-425. Sep. 2004.

TAKETANI, M., BAUDRY, M (Editors). *Advances in Network Electrophysiology: Using Multi-Electrode Arrays*. Berlin: Springer, 1st edition; 2006, 478 p.

TATENO, T.; KAWANA, A. e JIMBO, Y. Analytical characterization of spontaneous firing in networks of developing rat cultured cortical neurons. Physical Review E, 65(5): pp. 051924(1-16), 2002.

VAN PELT, J. et al. Dynamics and plasticity in developing neuronal networks *in vitro*. Progress in Brain Research, 147: pp. 171-188, 2005.

VAN PELT, J.; WOLTERS, P.S.; CORNER, M.A.; RUTTEN, W.L.; RAMAKERS, G.J. Long-term characterization of firing dynamics of spontaneous *bursts* in cultured neural networks. IEEE Trans Biomed Eng, v. 51, n. 11, p. 2051- 2062, November 2004.

VATO, A.; BONZANO, L.; CHIAPPALONE M. et al. *Spike* manager: a new tool for spontaneous and evoked neuronal networks activity characterization. Elsevier B. V. pp: 1153-1161. 2004.

WAGENAAR, D.A.; PINE, J.; et al. Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays. J. Neurosci. Methods, v.4, p.1-19. Mar. 2007.

Capítulo 3

Aplicação de Ferramentas Matemáticas para Cálculo da Transformada de Fourier, Autocorrelação, Densidade Espectral de Potência, Detecção de Picos e Coerência

3.1 INTRODUÇÃO

O objetivo deste capítulo é demonstrar o processamento dos sinais reais captados a partir de matrizes multieletrodo (MEA) e compará-los utilizando diferentes ferramentas, a fim de caracterizar tanto sinais normais (atividade espontânea) como patológicos (indução química) no que diz respeito ao sistema fisiológico destas células nas determinadas condições.

No que se diz respeito aos sinais biológicos, como, por exemplo, os sinais registrados em eletroencefalogramas (EEG), eletrocardiogramas (ECG), eletromiogramas (EMG) e matrizes multieletrodo (MEA), existem várias ferramentas que podem ser utilizadas para identificar padrões comuns, no caso de registros normais ou incomuns da atividade elétrica. Estas ferramentas são essenciais no processamento dos sinais, pois geram quantificadores importantes que possibilitam caracterizar o sistema biológico em estudo. Dessa maneira, é possível comparar quantitativamente registros de atividades diferenciadas, tanto para pesquisas de base dentro dessas áreas, como também para gerar ferramentas que auxiliam profissionais da saúde no diagnóstico de uma possível patologia.

Neste trabalho, o enfoque foi os sinais registrados pelo dispositivo: matriz multieletrodo (MEA). As MEAs são dispositivos construídos a partir de um substrato onde estão alojados 60 microeletrodos, os quais ficarão em contato com o corpo celular do neurônio (BORGES, 2009). Estes dispositivos têm diversas aplicações no campo da neurociência, que vão desde o entendimento do funcionamento do neurônio à utilização de neuroimplantes, além de também estarem sendo utilizados em estudos farmacológicos e de interface cérebro-máquina.

Dispomos neste trabalho o resultado de um estudo e familiarização de técnicas de processamento de sinais como: Transformada de Fourier, Autocorrelação, Densidade Espectral de Potência, Detecção de Pico e Coerência. Estas técnicas foram estudadas e aplicadas em sinais registrados pelo dispositivo matriz multieletrodo (MEA). As diversas ferramentas foram calculadas tanto para sinais de condições experimentais normais (atividade espontânea), como sinais de experimentos de estimulação química.

3.1.1 Estado-da-arte da atividade espontânea

A atividade elétrica espontânea é uma forma primitiva de atividade celular. Sua função está relacionada com a regulação de diversos processos de desenvolvimento neuronal e com a formação de novas conexões como na diferenciação neuronal, na determinação do fenótipo neurotransmissor, na migração neuronal, no crescimento axônico e formação de dendritos, no desenvolvimento dos canais iônicos, entre outros. Em um estágio mais adiantado de desenvolvimento, a atividade elétrica espontânea entre neurônios se consolida e as conexões excitatórias vão amplificar a despolarização nas células espontaneamente ativas, iniciando assim uma atividade espontânea de rede (BLANKENSHIP, 2010).

3.1.2 Estado-da-arte da atividade estimulada

Neurônios cultivados em MEAs representam um sistema de biosensoriamento para aplicações neurofarmacológicas, seja estudando efeitos de drogas desconhecidas e/ou detectando compostos tóxicos, porque a adição de químicos modula a atividade eletrofisiológica de redes neuronais, quando comparada à atividade espontânea intrínseca dos neurônios cultivados (MARTINOIA, 2005).

No experimento utilizado, a estimulação química foi realizada através do fármaco APV (D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid), que é um antagonista de receptores NMDA. O aumento da concentração de antagonistas, como o APV, diminui significativamente a taxa média de disparos de *spikes* (MFR) e a taxa média de ocorrência de *bursts* (MBR) em relação à condição controle (atividade espontânea). Isso ocorre porque a atividade sináptica excitatória devido ao glutamato é deprimida, uma vez que os canais iônicos dos receptores NMDA foram

bloqueados (MARTINOIA, 2005). Dessa maneira, a adição de APV restringe a atividade elétrica da rede neuronal.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Os Sinais da MEA

A MEA utilizada foi a MEA60 (MULTI CHANNEL SYSTEMS, 2005) que contém 60 microeletrodos de 30 micrômetros de diâmetro cada e 200 micrômetros de espaçamento entre eles (Figura 3.1). Esses eletrodos são distribuídos em uma matriz 8x8, com os cantos excluídos. Cada registro seguiu o mesmo procedimento: as MEAs povoadas com as culturas eram retiradas da estufa de CO₂ na qual eram mantidas e colocadas sobre um amplificador cuja temperatura era controlada, podendo variar de 37,1 a 37,4 °C. As medidas eram iniciadas após 20 minutos, com o objetivo de permitir às células se adaptarem ao novo ambiente. Em cada experimento coletaram-se 20 minutos de amostra do sinal da MEA, divididos em quatro fases de 5 minutos cada, sendo as medidas subsequentes.

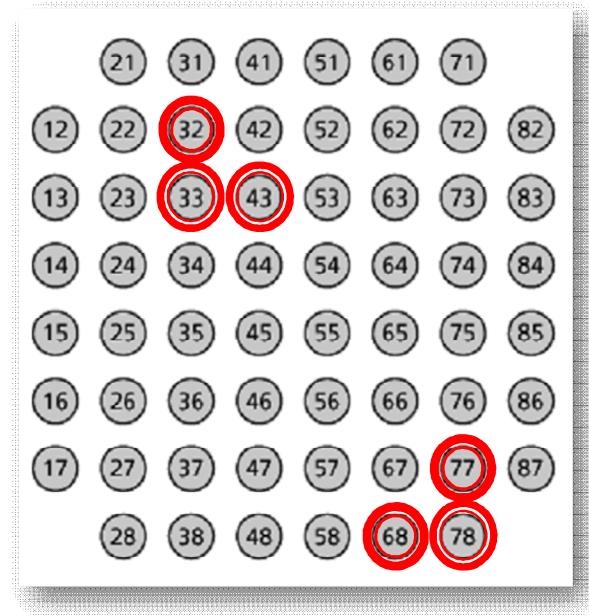


Figura 3. 1 – Disposição dos eletrodos de uma Matriz Multieletrodo

É importante salientar que todas as MEAs utilizadas possuíam referimento interno, sendo este o eletrodo 15. Em todas as MEAs que foram coletados sinais, o eletrodo 15 não possui registro de atividade neural, apenas o sinal de fundo, que corresponde aos ruídos que influenciam no sinal (térmicos, elétricos, entre outros). Por este motivo, para toda e qualquer análise dos sinais, sempre deve ser excluída a atividade observada no eletrodo 15. A freqüência de aquisição dos sinais para estes experimentos foi de 10 kHz.

Neste trabalho, foram processados os primeiros 100 milissegundos do sinal registrado pelos canais 32, 33, 43, 68, 77 e 78, dispostos conforme a Figura 3.1. Estes canais foram escolhidos com o propósito de observar se existe interação ou indícios de conectividade entre aqueles que estão muito próximos e com o outro mais distante. Devido à grande quantidade de dados, foram processadas duas etapas do experimento 58, o **Basale3** (atividade elétrica espontânea) e o **Apv3_1** (atividade elétrica estimulada por adição de APV 100 μ M), cujos sinais podem ser visualizados nas Figuras 3.2 e 3.3, respectivamente.

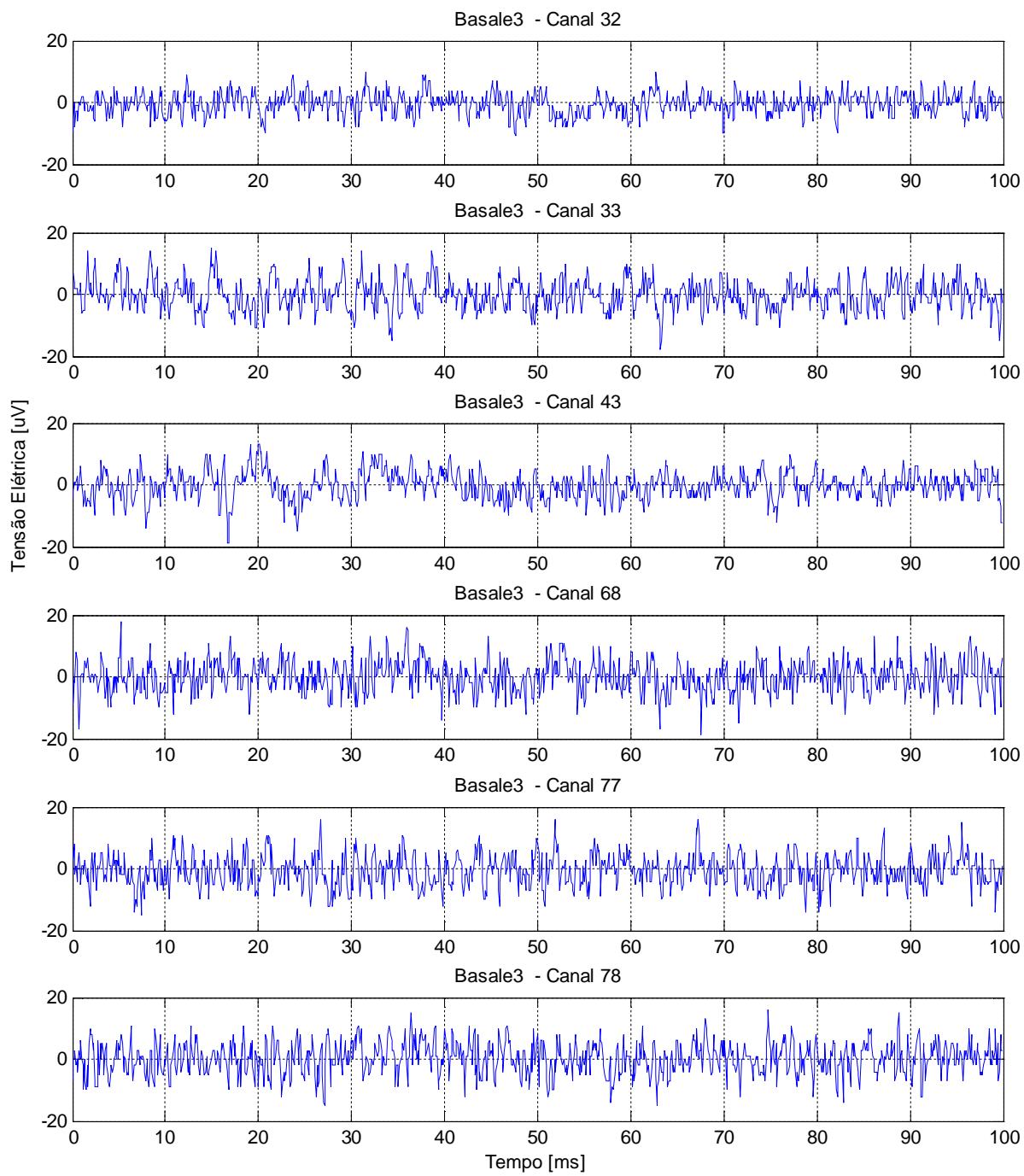


Figura 3. 2 - Sinais registrados de atividade espontânea (Basale3) para os canais 32, 33, 43, 68, 77 e 78.

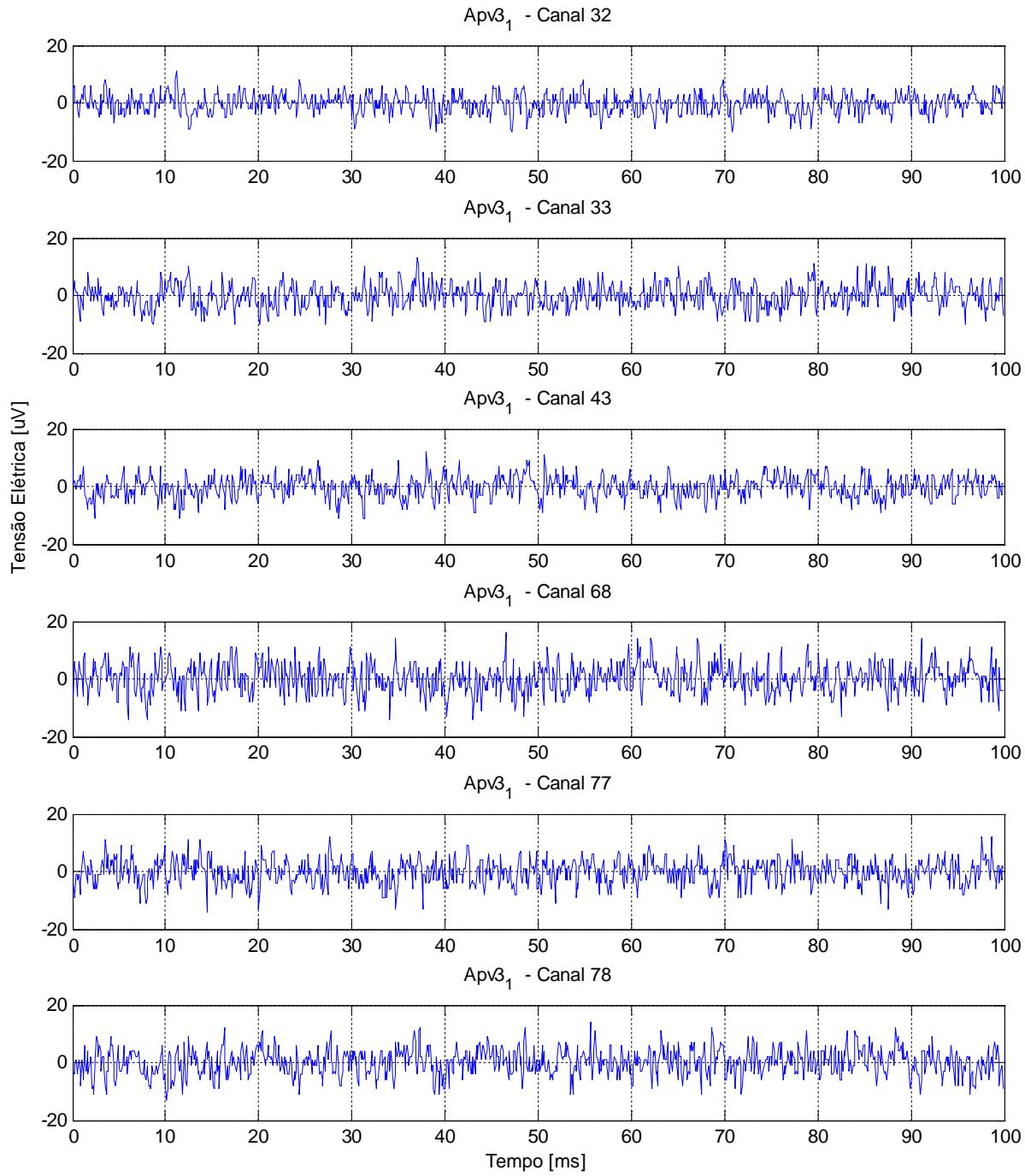


Figura 3. 3 - Sinais registrados de atividade estimulada por APV para os canais 32, 33, 43, 68, 77 e 78.

3.2.2 Transformada de Fourier

Transformada de Fourier (TF) trata-se de um conjunto de cálculos integrados que irá decompor o sinal biológico nas suas componentes de frequência e amplitude. O principal

quantificador gerado é o gráfico do espectro da potência do sinal, pelo qual é possível extrair informações fundamentais acerca das frequências predominantes do sinal biológico, que podem caracterizá-lo como normal ou patológico.

A transformada de Fourier apresenta o sinal analisado como resultante da decomposição do mesmo em um número infinito de senóides e cossenóides, com freqüências distintas acima e abaixo de uma freqüência fundamental, transformando uma seqüência temporal numa representação espectral.

A transformada de Fourier de uma função integrável $f(t)$ é definida conforme equação 3.1

$$\mathfrak{F}[f(t)] = F(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{-j\omega t} dt \quad (3.1)$$

e a transformada inversa que recupera a função original é definida conforme equação

$$f(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} F(\omega) e^{j\omega t} d\omega \quad (3.2)$$

Assim, temos que $F(\omega)$ é uma representação do sinal $f(t)$ no domínio da freqüência representando as amplitudes de várias componentes de freqüência da função.

FourierFourierFourierFourierFourierFourier

Dessa maneira, consideramos um exemplo simples da aplicação da Transformada de Fourier em MATLAB, utilizando uma senóide de amplitude 0.7 e freqüência de 50 Hz, como representado na Figura 3.4.

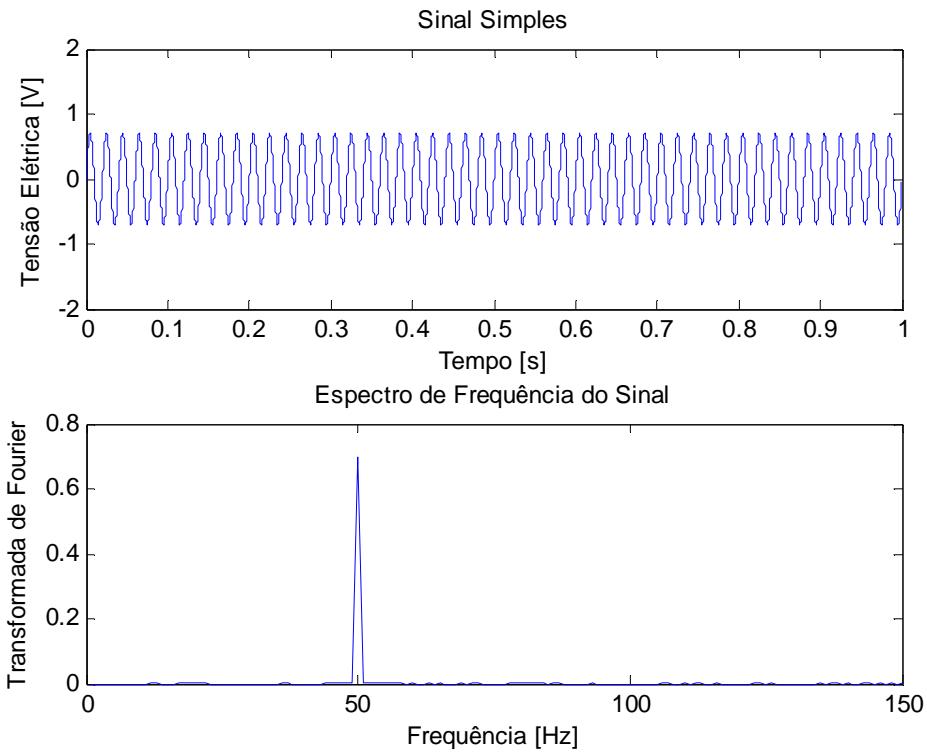


Figura 3.4 - Transformada de Fourier de uma senóide de amplitude 0.7 e freqüência de 50 Hz

3.2.3 Autocorrelação

Autocorrelação é a medida do grau de similaridade de um sinal com ele mesmo deslocado no tempo. É um método de análise no domínio do tempo que é bastante útil para o estabelecimento do grau de coerência de sinais aleatórios e para a determinação do tempo de captação e análise destes sinais.

A função de autocorrelação $R_x(t_1, t_2)$ de um processo estacionário é definida como a esperança matemática do produto $[X(t_1)X(t_2)]$ em termos de função densidade de probabilidade conjunta $p(x_1, x_2; t_1, t_2)$ como (equação 3.3):

$$R_x(t_1, t_2) = E[X(t_1)X(t_2)] = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} x_1 x_2 p(x_1, x_2; t_1, t_2) dx_1 dx_2 \quad (3.3)$$

Assumindo que $\tau = t_2 - t_1$, a equação 3.3 pode ser escrita conforme equação 3.4

$$R_x(t, t + \tau) = E[X(t) X(t + \tau)] \quad (3.4)$$

Dessa maneira, consideramos um exemplo simples da aplicação da Autocorrelação em MATLAB, utilizando uma senóide de amplitude 0.7 e freqüência de 50 Hz, como representado na Figura 3.5.

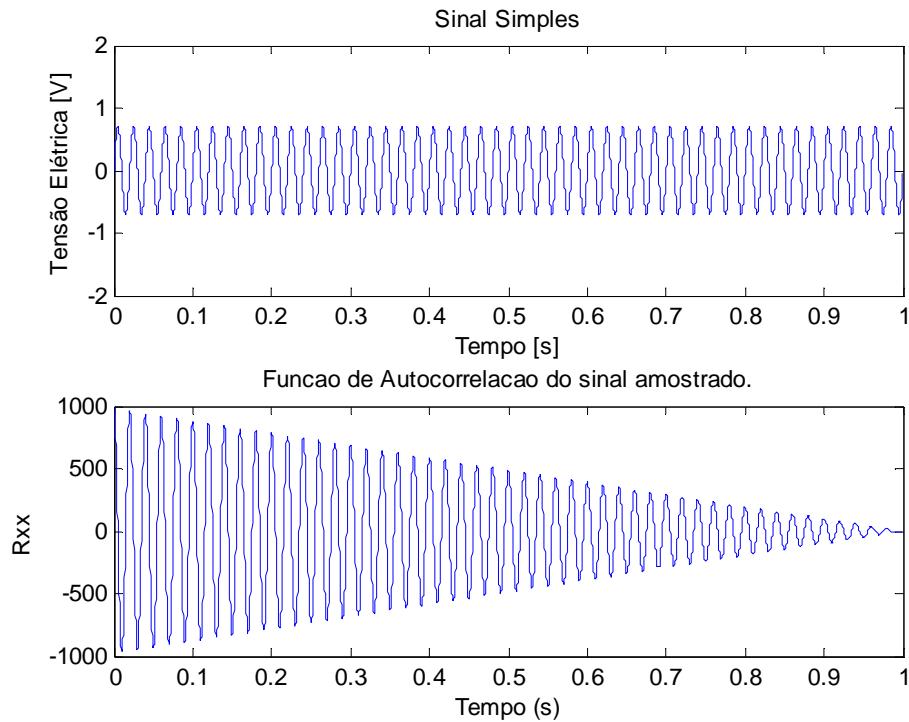


Figura 3. 5 - Função autocorrelação de uma senóide de amplitude 0.7 e freqüência de 50 Hz

Utilizando a autocorrelação, (JOHNSON, 2008) desenvolveu uma matriz microeletrodos para gravação simultânea de sinais eletrofisiológicos endógenos de dopamina extra-sináptica. Os experimentos mostraram um exemplo de dois tipos diferentes de respostas gravadas simultaneamente sobre a mesma rede de microeletrodos. No primeiro, a resposta do neurônio foi excitatória, enquanto que no segundo, outros neurônios apresentaram uma resposta inibitória em paralelo ao excesso de dopamina. Além disso, através de autocorrelogramas, foi possível notar uma maior incidência de *bursting* no segundo caso, em relação ao primeiro.

3.2.4 Densidade Espectral de Potência

Para uma análise do sinal no domínio da frequência utilizamos uma ferramenta denominada densidade espectral de potência. A análise do sinal no domínio da frequência pode oferecer algumas informações a mais que escapam à análise no domínio do tempo.

Para o cálculo da densidade espectral de potência precisa-se saber o conceito de Transformada de Fourier. A densidade espectral de potência para um processo estacionário no sentido amplo é definida como a Transformada de Fourier da função de autocorrelação do processo aleatório, ou seja,

$$\begin{aligned} S_x(\omega) &= \int_{-\infty}^{\infty} R_x(\tau) e^{-j\omega\tau} d\tau \\ R_x(\tau) &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} S_x(\omega) e^{-j\omega\tau} d\omega \end{aligned} \tag{3.5}$$

A função densidade espectral de potência ($S_x(\omega)$ ou $S_x(f)$) descreve como é distribuída a energia de potência de uma série temporal no domínio da frequência. A função $S_x(\omega)$ pode ser calculada tanto para processos determinísticos quanto para processos estocásticos. A sua unidade é Watts/Hertz.

Fourier

Dessa maneira, consideramos um exemplo simples da aplicação da Densidade Espectral de Potência em MATLAB, utilizando uma senóide de amplitude 0.7 e freqüência de 50 Hz, como representado na Figura 3.6.

No trabalho realizado por (YANLING-LI, 2007), foram analisadas as mudanças dos *bursts* espontâneos sincronizados em culturas neuronais do hipocampo nos processos de aprendizagem e memória utilizando a Densidade Espectral de Potência dos sinais (PSD). Os pesquisadores constataram que, antes de aprender, a PSD do sinal na rede neuronal foi maior quando a frequência do sinal foi inferior a 3 Hz. Após a aprendizagem, a PSD foi maior quando a frequência do sinal foi de 4Hz a 6Hz. Na condição de "não-aprendizagem", a PSD foi maior somente quando a frequência do sinal era inferior a 3Hz .

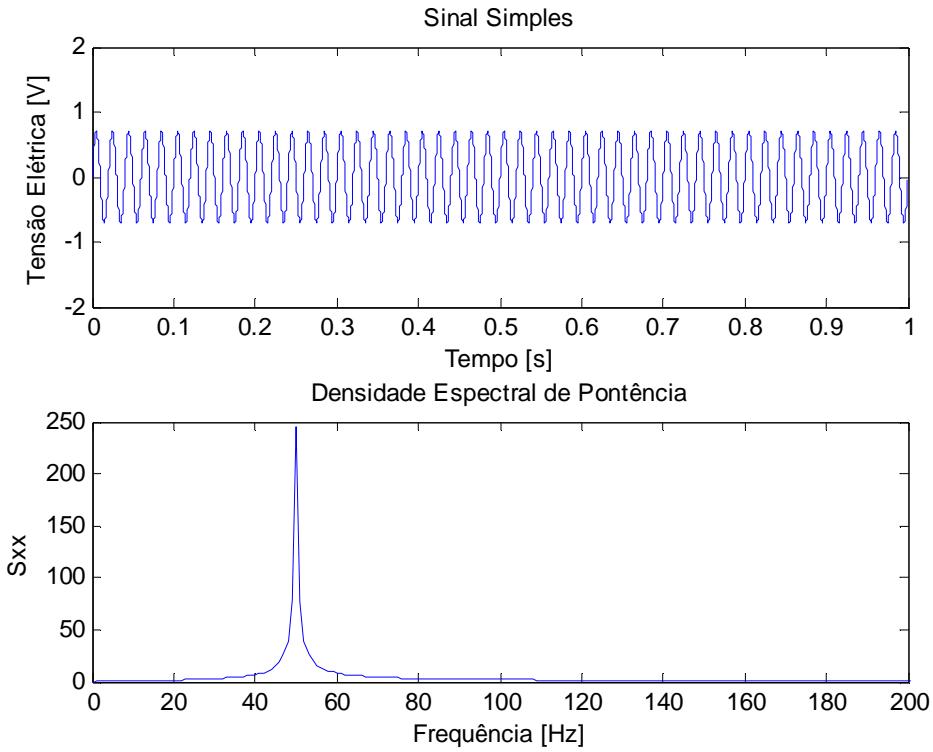


Figura 3.6 - Densidade espectral de potência calculada para uma senóide de amplitude 0.7 e frequência de 50 Hz

3.2.5 Detecção de Pico

Um sinal em um microeletrodo é composto por *spikes* e *bursts*. Os *spikes* são variações extremamente rápidas de tensão elétrica de um neurônio ou de um grupo de neurônios, enquanto que um conjunto de *spikes* é uma sequência de impulsos nervosos ou potenciais de ação, produzidos por um ou mais neurônios, sendo o mesmo observado por um período de tempo relativamente longo. Os *bursts* são sequências de *spikes* que são separados entre si por tempos muito reduzidos, tipicamente menores que 100 ms (MARQUES et al., 2010).

Para detectar a presença de *spikes*, o valor de entrada é calculado como um múltiplo do desvio padrão do ruído amostrado para cada eletrodo durante a fase da atividade basal. A janela é deslocada ao longo do sinal; quando a diferença entre o máximo e o mínimo na janela corrente iguala ao critério de entrada, o correspondente *spike* é armazenado. Enquanto a ferramenta efetua a detecção de *spikes*, a taxa de disparo médio é computada e esses parâmetros são armazenados numa matriz esparsa.

Alguns parâmetros padrões são utilizados no processamento dos dados. O valor do limiar estabelecido para detecção de picos é calculado como sendo 8 vezes o desvio padrão de uma janela do sinal dimensionada de modo a não conter picos (CHIAPPALONE, 2003). A frequência de amostragem é ajustada a 10.000 amostras por segundo. A detecção de picos é baseada em uma janela de 2 milissegundos que desliza ao longo do sinal. O valor de limiar de artefato é de 800 μ V e a distância mínima de artefato é de 0,5 segundos.

Dessa maneira, consideramos um exemplo simples da aplicação de Detecção Pico em MATLAB, utilizando uma senóide de amplitude 0.7 e freqüência de 50 Hz, como representado na Figura 3.7.

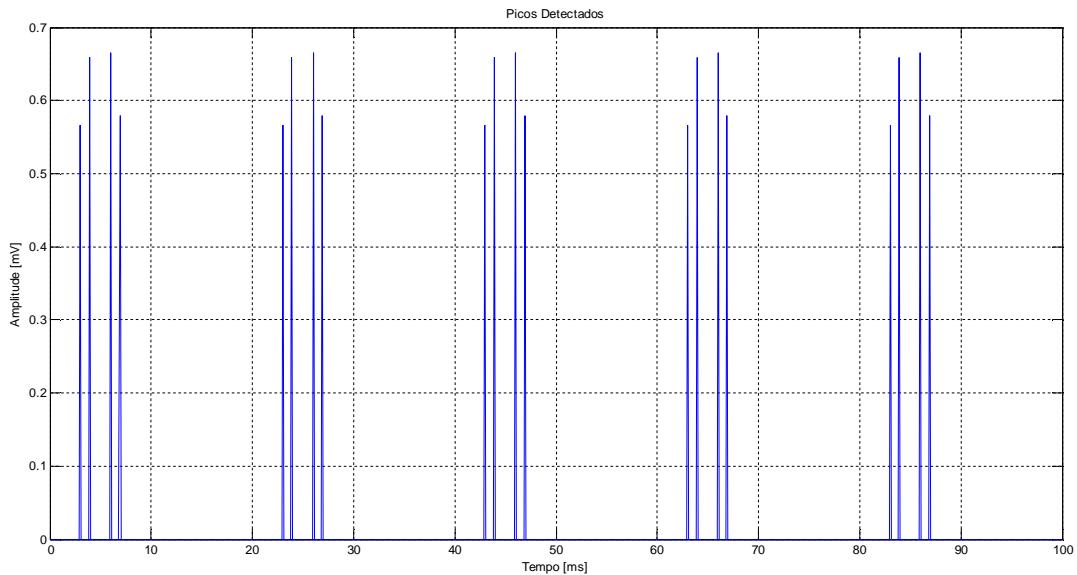


Figura 3.7 - Detecção de Picos calculada para de uma senóide de amplitude 0.7 e frequência de 50 Hz

3.2.6 Coerência

A função coerência $\Gamma_{xy}(\omega)$ fornece uma medida quantitativa das faixas de frequência compartilhadas por dois sinais distintos (SÖRNMO et al., 2005). Geralmente encontra-se na literatura a função coerência quadrática $\Gamma_{xy}^2(\omega)$ que mede o grau de similaridade entre dois sinais distintos quantitativamente.

$$\Gamma_{xy}^2(\omega) = \frac{|S_{xy}(\omega)|^2}{S_x(\omega)S_y(\omega)} \quad (3.6)$$

Da Equação 3.6 tem-se que $S_{xy}(\omega)$ é a densidade espectral de potência cruzada do sinal x com o sinal y, $S_x(\omega)$ é a densidade espectral de potência do sinal x que foi calculada como a Transformada de Fourier da autocorrelação do sinal x e, por fim, $S_y(\omega)$ é a densidade espectral de potência do sinal y. A função coerência quadrática possui valores entre zero e um, conforme Equação 3.7.

$$0 \leq |\Gamma_{xy}(\omega)|^2 \leq 1 \quad (3.7)$$

Em casos de a função coerência quadrática assumir valores próximos de zero ($|\Gamma_{xy}(\omega)|^2 \approx 0$), pode-se dizer que não existe correlação estatística entre os sinais e eles não possuem similaridade entre si, ou seja, o que acontece em um não acontece ou influencia no outro.

Dessa maneira, consideramos um exemplo simples da aplicação da Coerência em MATLAB, utilizando uma senóide de amplitude 1.5 e freqüência de 5 Hz (sinal 1) e uma senóide de amplitude 0.7 e freqüência de 50 Hz (sinal 2), conforme Figura 3.8.

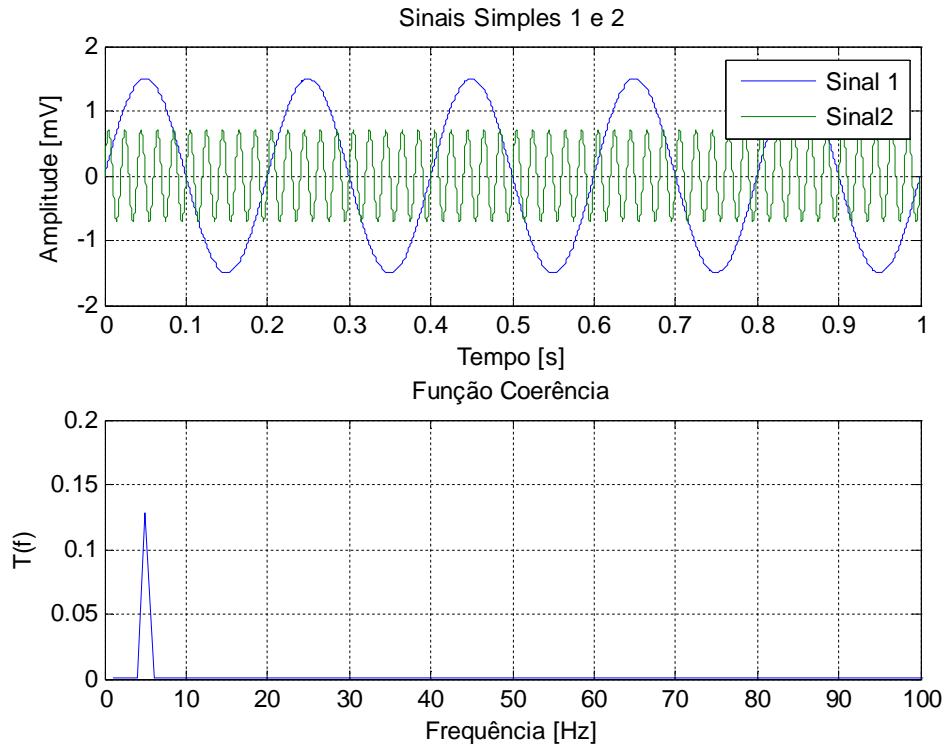


Figura 3.8 - Calculo da Coerência de um sinal 1 de 5Hz com um sinal 2 de 50 Hz

No estudo de (BERDONDINI, 2009), foi definido conectividade neural funcional como a coerência temporal entre a atividade de neurônios diferentes que é tido para corresponder à atividade sincronizada entre as atividades elétricas em regiões distintas do cérebro em bandas de freqüência específica. Dessa maneira, mapas de conectividade funcional foram calculados de acordo com a análise de correlação cruzada. Esta análise mostra que a realização da correlação cruzada em trens adquiridos de *spikes* de matrizes de alta resolução permite extrair informações mais detalhadas sobre a conectividade funcional da rede, tanto a nível local, quanto global.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Transformada de Fourier

Os resultados do processamento podem ser visualizados na Figura 3.9, a comparação entre a situação original (Basale3) e a de estímulo químico (Apv3), e na Figura 3.10, a comparação entre os canais 33, 43 e 78, respectivamente.

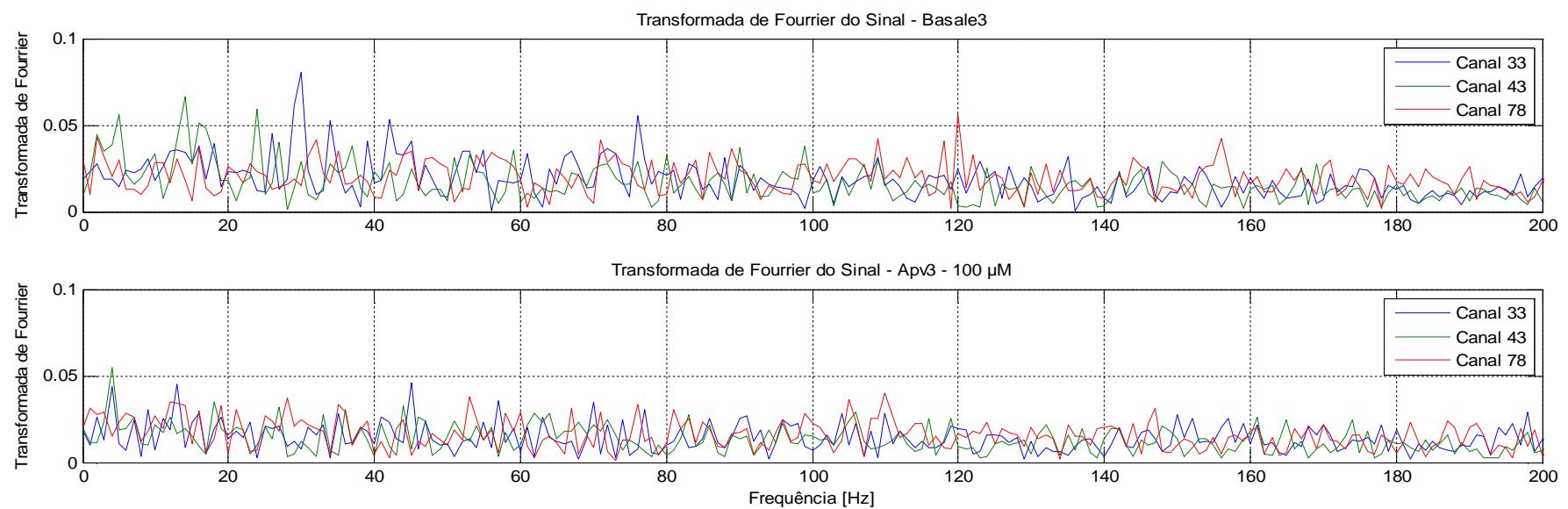


Figura 3.9 - Transformada de Fourier calculada a partir de um intervalo de 0 a 100ms, acima, para um sinal de atividade espontânea (Basale3) e, abaixo, para um sinal de atividade estimulada (APV3_1).

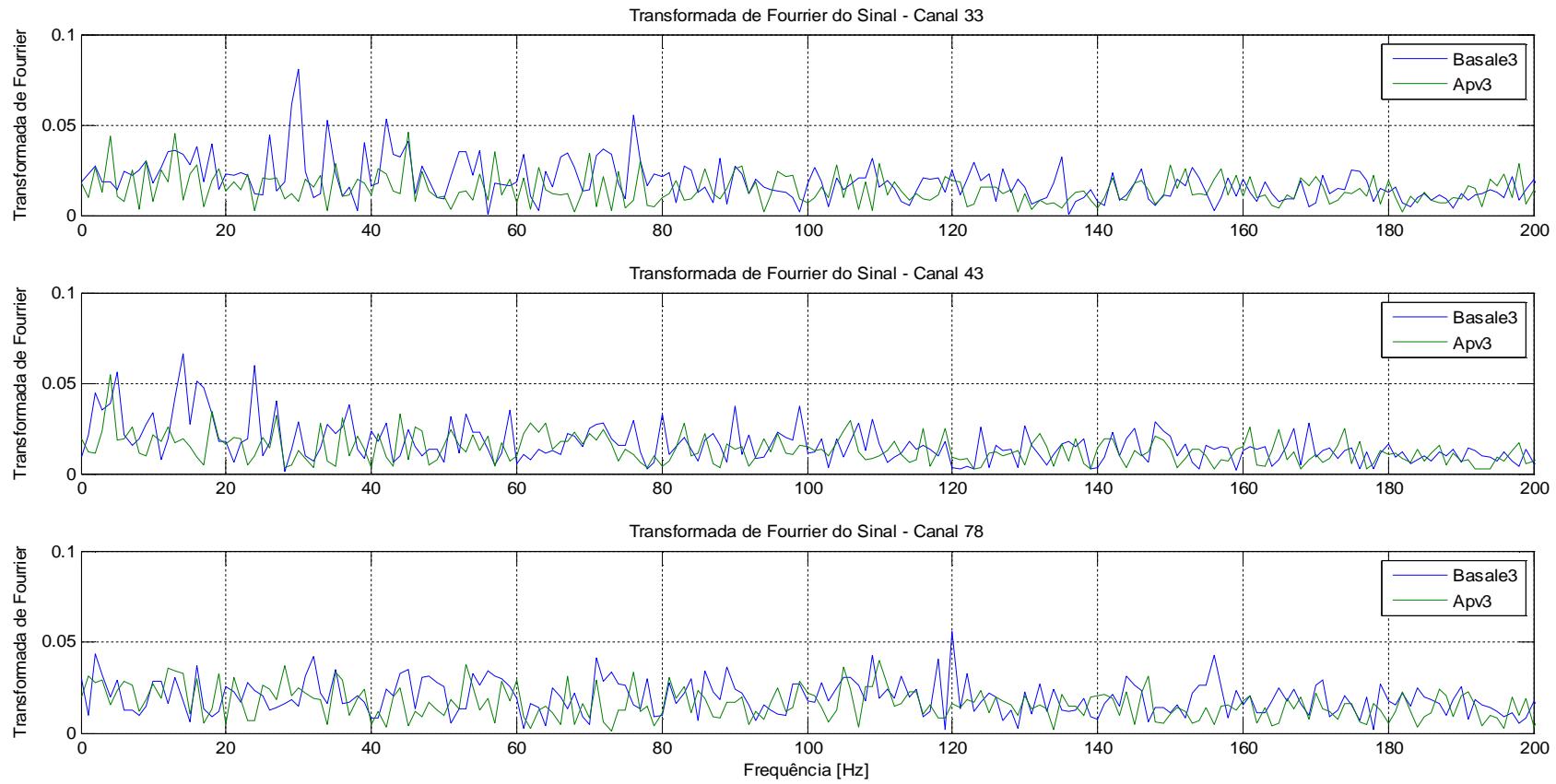


Figura 3.10 - Transformada de Fourier calculada a partir de um intervalo de 0 a 100ms, comparando o sinal de atividade espontânea com o de atividade estimulada no canal 33 (acima), canal 43 (ao centro) e canal 78 (abaixo).

3.3.2 Autocorrelação

Os resultados do processamento podem ser visualizados na Figura 3.11, a comparação entre a situação original (Basale3) e a de estímulo químico (Apv3), e na Figura 3.12, a comparação entre a média dos canais 32, 33, 43 e 68, 77, 78, respectivamente.

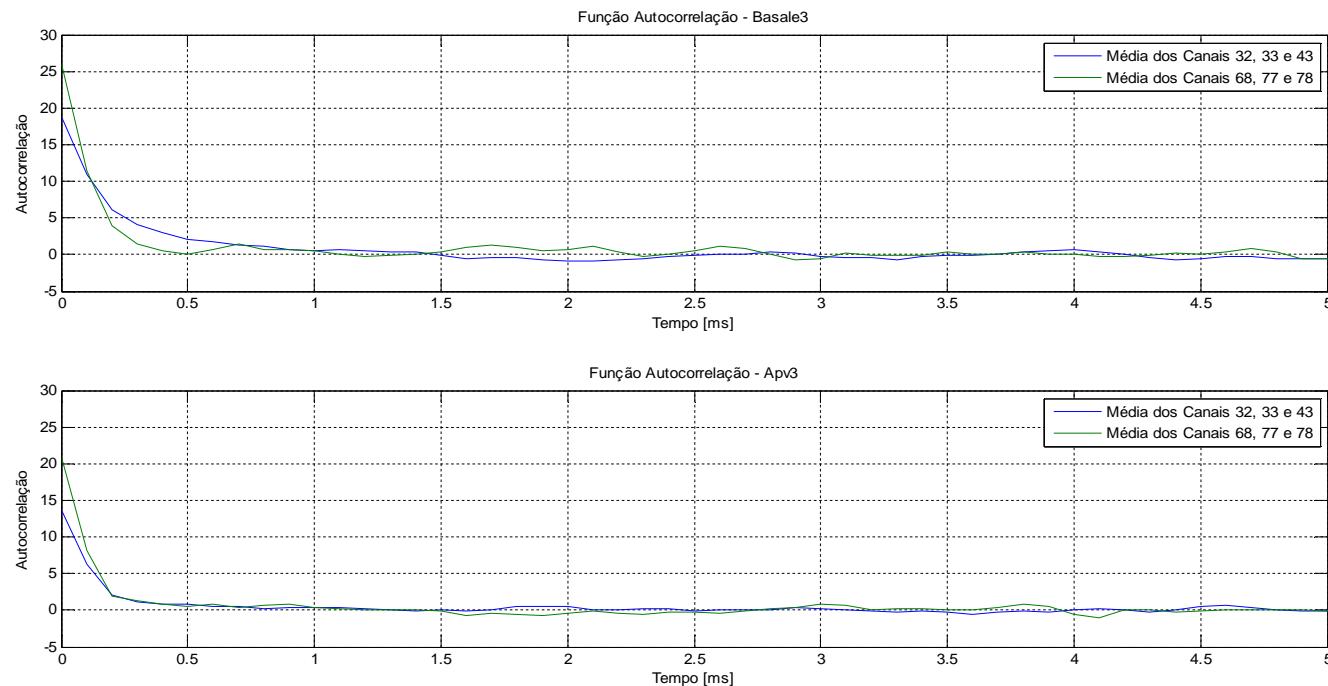


Figura 3. 11 - Autocorrelação calculada a partir de um intervalo de 0 a 100ms, acima, para médias de um sinal de atividade espontânea (Basale3) e, abaixo, para um sinal de atividade estimulada (APV3_1).

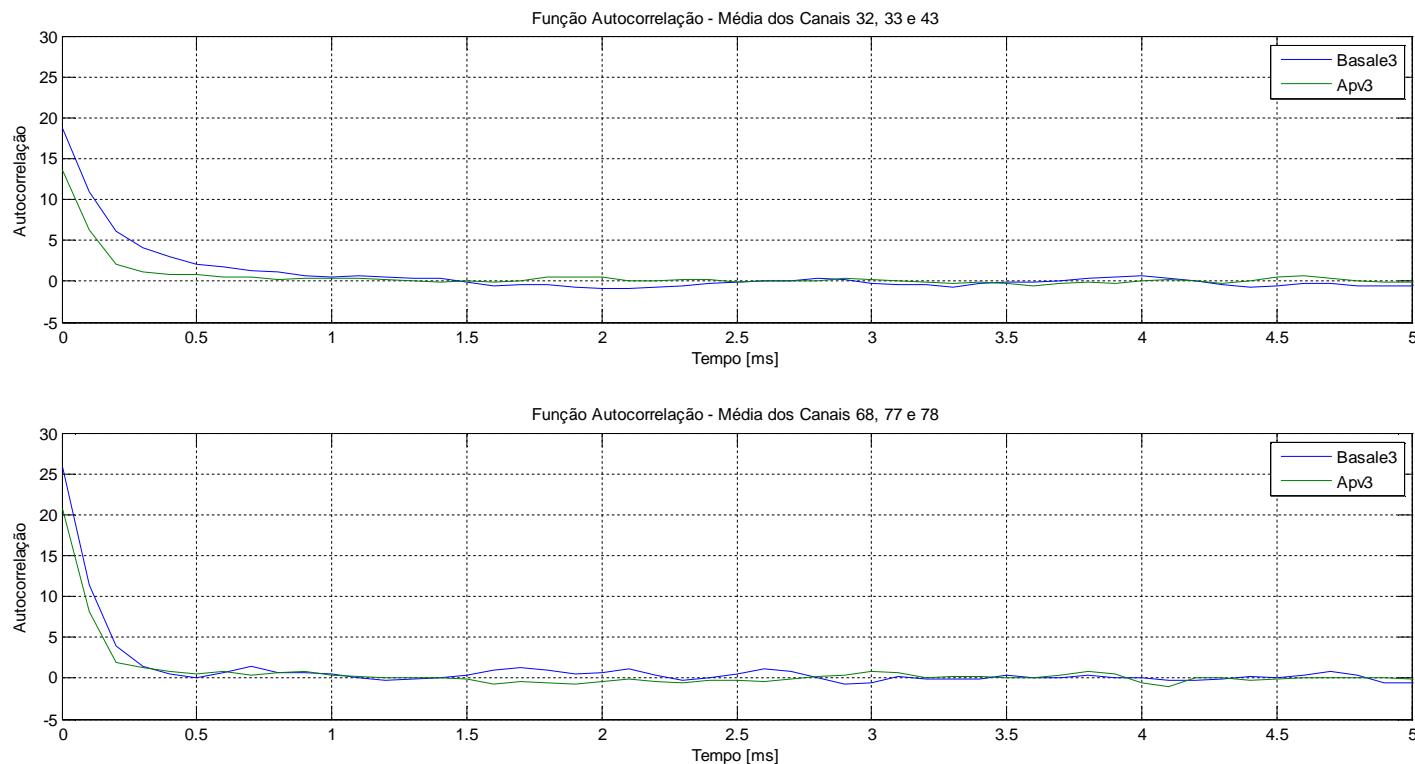


Figura 3.12 - Autocorrelação calculada a partir de um intervalo de 0 a 100ms, comparando o sinal de atividade espontânea com o de atividade estimulada em relação à média dos canais 32, 33 e 43 (acima) e à média dos canais 68, 77 e 78 (abaixo).

3.3.3 Densidade Espectral de Potência

Os resultados do processamento podem ser visualizados na Figura 3.13, a comparação entre a situação original (Basale3) e a de estímulo químico (Apv3), e na Figura 3.14, a comparação entre a média dos canais 32, 33, 43 e 68, 77, 78, respectivamente.

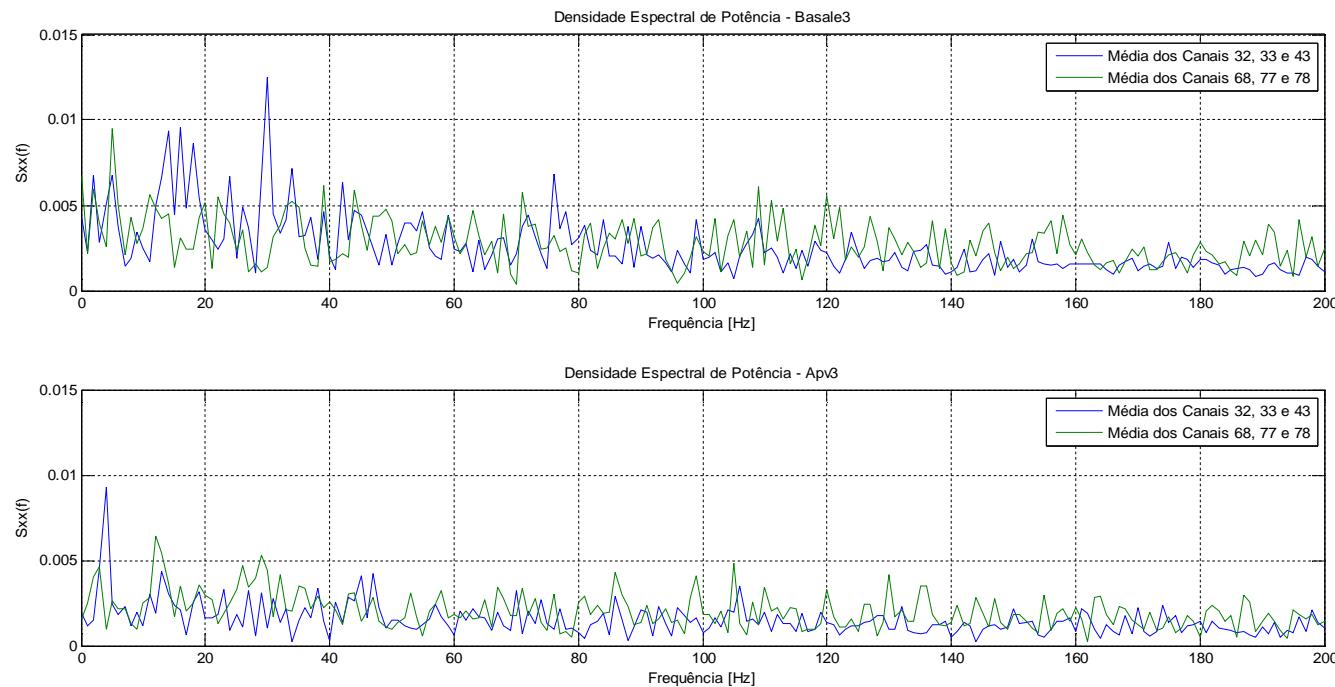


Figura 3. 13 - Densidade Espectral de Potência calculada a partir de um intervalo de 0 a 100ms, acima, para médias de um sinal de atividade espontânea (Basale3) e, abaixo, para um sinal de atividade estimulada (APV3_1).

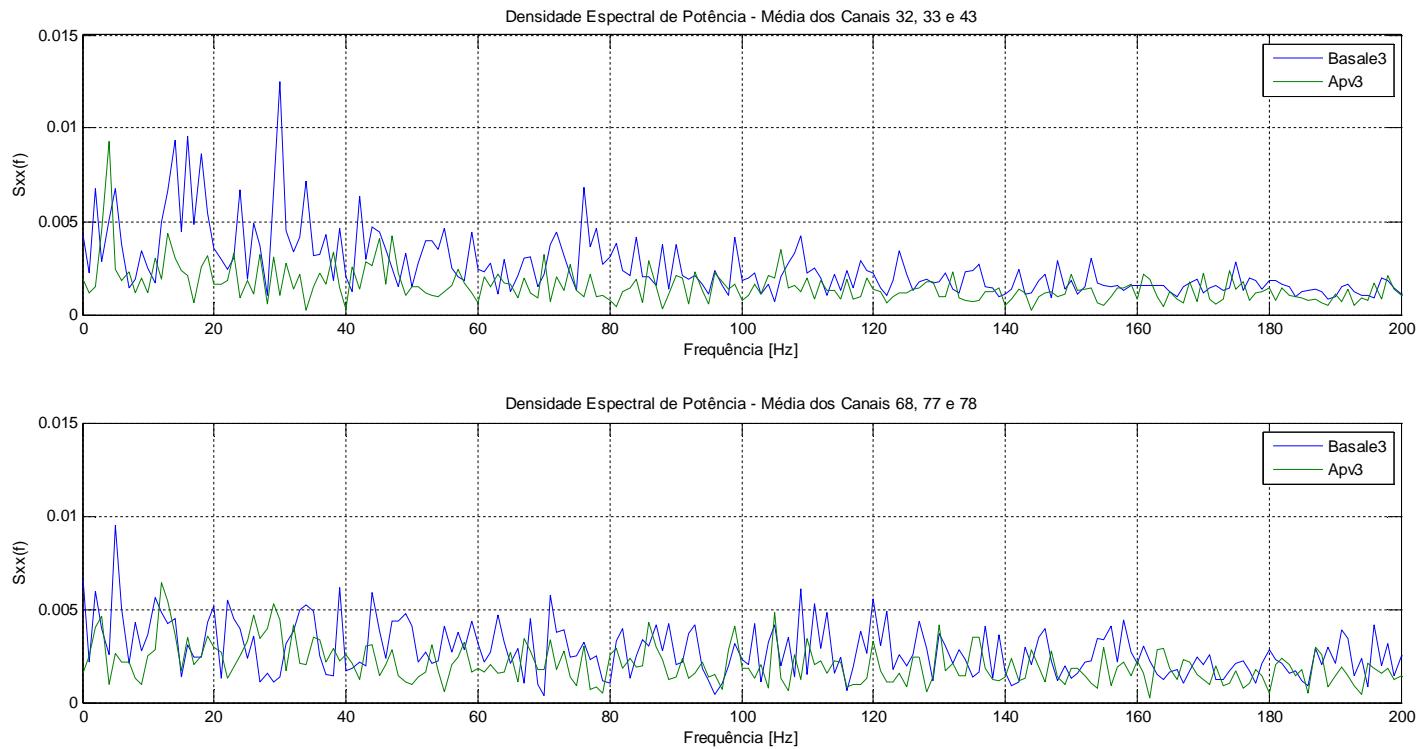


Figura 3.14 - Densidade Espectral de Potência calculada a partir de um intervalo de 0 a 100 ms, comparando o sinal de atividade espontânea com o de atividade estimulada em relação à média dos canais 32, 33 e 43 (acima) e à média dos canais 68, 77 e 78 (abaixo).

3.3.4 Detecção Pico

Os resultados do processamento podem ser visualizados na Figura 3.15, a comparação entre a situação original (Basale3) e a de estímulo químico (Apv3), e na Figura 3.16, a comparação entre os canais 33, 43 e 78, respectivamente.

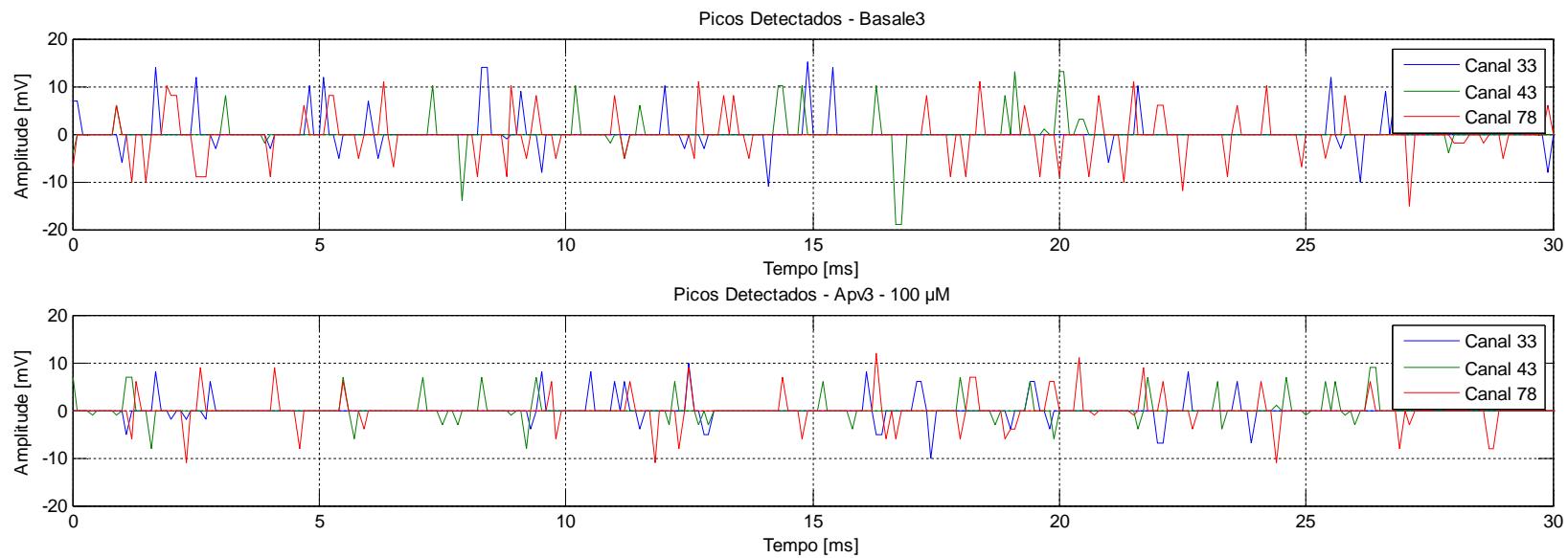


Figura 3. 15 - Detecção de picos calculada a partir de um intervalo de 0 a 100ms, acima, para um sinal de atividade espontânea (Basale3) e, abaixo, para um sinal de atividade estimulada (APV3_1).

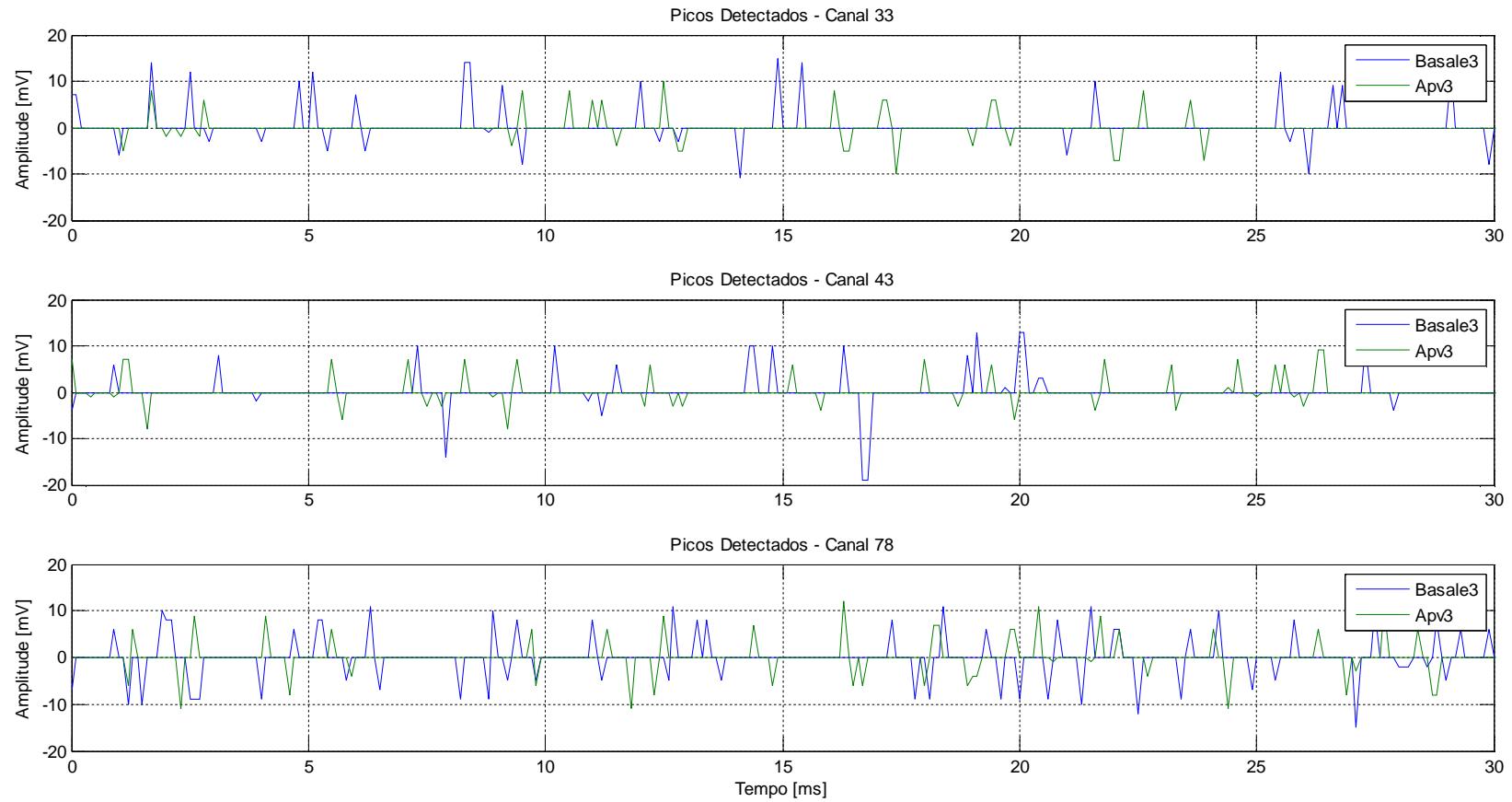


Figura 3.16 - Detecção de picos calculada a partir de um intervalo de 0 a 100ms, comparando o sinal de atividade espontânea com o de atividade estimulada entre os canais 33 e o 43 (acima) e entre os canais 33 e 78 (abaixo).

3.3.5 Coerência

Os resultados do processamento podem ser visualizados na Figura 3.17, a comparação entre a situação original (Basale3) e a de estímulo químico (Apv3), e na Figura 3.18, a comparação entre os canais 33-43 e 33-78, respectivamente.

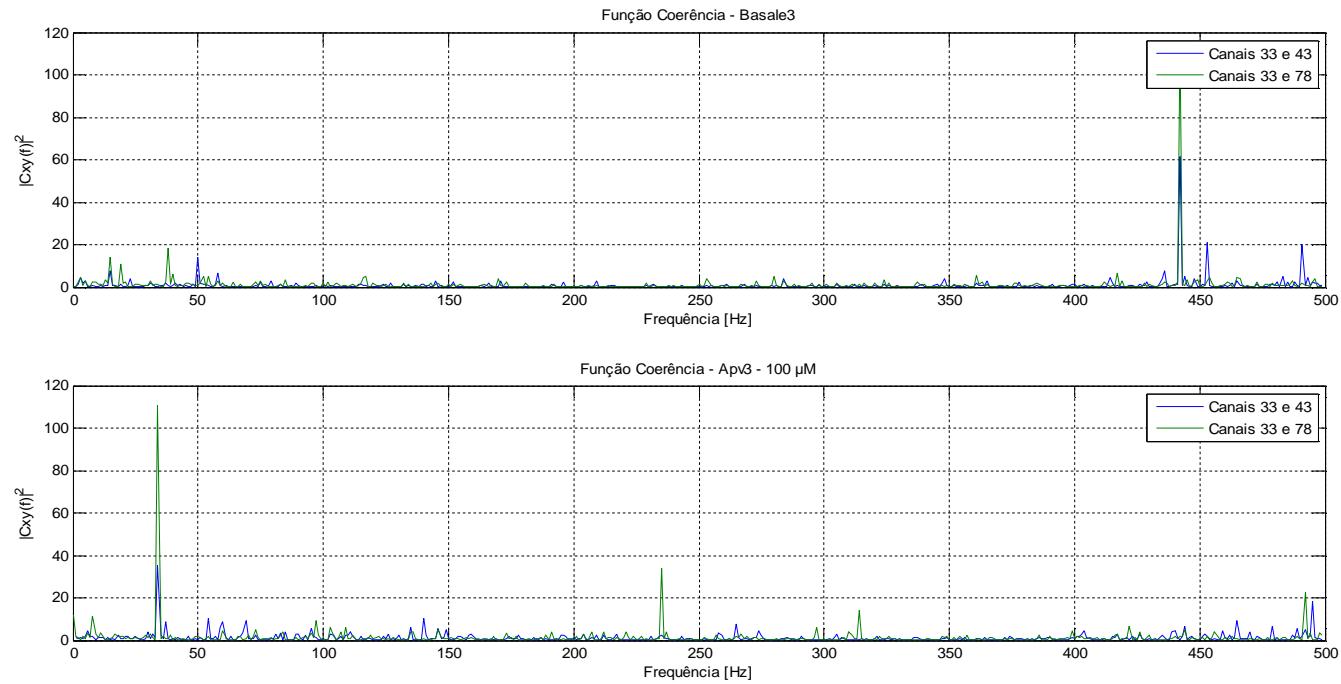


Figura 3. 17 - Função Coerência calculada a partir de um intervalo de 0 a 100ms, acima, para um sinal de atividade espontânea (Basale3) e, abaixo, para um sinal de atividade estimulada (APV3_1).

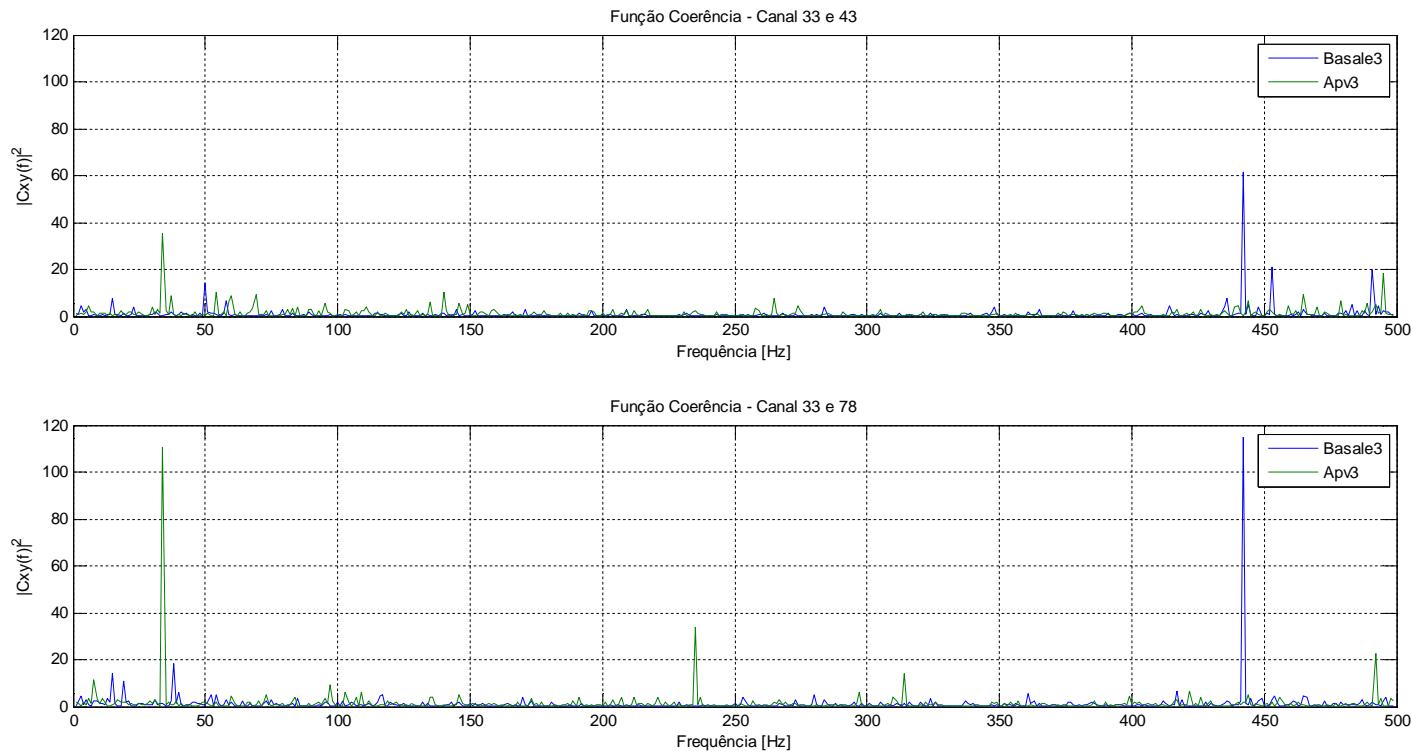


Figura 3. 18 - Função Coerência calculada a partir de um intervalo de 0 a 100ms, comparando o sinal de atividade espontânea com o de atividade estimulada entre os canais 33 e o 43 (acima) e entre os canais 33 e 78 (abaixo).

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Sinais de Atividade Espontânea

Analizando os resultados obtidos a partir da aplicação das ferramentas matemáticas nos sinais captados a partir de matrizes multieletrodo, destacam-se alguns detalhes que serão apresentados na sequência.

A primeira ferramenta utilizada foi a Transformada de Fourier. Observou-se que para atividade espontânea, os picos de Transformada de Fourier foram mais expressivos nos três canais (33, 43 e 78), apresentando assim valores de Transformada de Fourier maiores. Além disso, a relação das Transformadas de Fourier é muito semelhante, pois para a mesma condição de cultura, obtevem-se resultados parecidos em diferentes canais.

A segunda ferramenta apresentada e utilizada no processamento dos sinais foi a Autocorrelação. Neste caso, não foi possível obter resultados expressivos, já que houve um decaimento grande da autocorrelação até 5 milissegundos para todos os sinais processados e após este tempo, a autocorrelação tendeu a zero. Pode-se dizer que a autocorrelação das médias dos canais são similares, tanto para a atividade espontânea, quanto para a atividade estimulada.

Analizando a Densidade Espectral de Potência, que foi a terceira ferramenta utilizada no processamento dos mesmos sinais citados anteriormente, observou-se que os valores mais expressivos de Densidade Espectral de Potência para a condição de atividade espontânea é de até 50 Hz. Além disso, a relação das Densidades Espectrais de Potência é muito semelhante após 50 Hz, pois para a mesma condição de cultura (atividade espontânea e atividade estimulada), obtevem-se resultados parecidos para diferentes canais.

Ao analisarmos a Coerência onde se comparou dois canais próximos com dois canais distantes (33 e 43, 33 e 78), observou-se que entre canais próximos, existem mais picos

de frequências similares. Porém, entre canais distantes, existem poucos picos de frequências similares, mas a amplitude da coerência é maior nestes casos. Além disso, para todas as condições de atividade espontânea, parece haver uma atividade neural significativa em 440 Hz.

Na detecção de Picos, observamos que houve maior quantidade de picos visíveis no canal 78, tanto na atividade espontânea, quanto na atividade estimulada. Porém uma maior quantidade de picos pode ser vista para a condição de atividade espontânea.

3.4.2 Sinais de Atividade Estimulada

Analizando as mesmas ferramentas para sinais de atividade estimulada, pode-se verificar que para a aplicação da Transformada de Fourier nestes sinais, não se encontram frequências significativas, pois o espectro dos sinais está distribuído em todo o espectro de frequências.

A segunda ferramenta utilizada para processamento dos sinais de atividade estimulada foi a autocorrelação. Como mencionado anteriormente, a autocorrelação média dos canais são similares, tanto para a atividade espontânea, quanto para a atividade estimulada. A média dos canais 68, 77 e 78 apresentou maior autocorrelação, já que a amplitude foi maior tanto para a atividade espontânea, quanto para a atividade estimulada. Além disso, o decaimento da autocorrelação para a média dos canais 68, 77 e 78 é mais expressivo.

Ao processar os dados de atividade estimulada utilizando a terceira ferramenta, que é a Densidade Espectral de Potência, observou-se que existiu um pico maior até 5 Hz e após esta frequência, praticamente não houve alteração do valor de Densidade Espectral de Potência, denotando que a frequência mais significativa para os experimentos realizados com estimulação química é de 5 Hz.

Para os dados de atividade estimulada por APV 100 μM processados utilizando a ferramenta Coerência, parece haver uma atividade neural significativa em 40 Hz e entre

canais distantes (33 e 78) a amplitude da função foi maior tanto para atividade estimulada como para a espontânea.

Na última ferramenta (Detecção de Picos) observa-se que a amplitude e a frequência dos picos parece ser menor no experimento de estimulação química por APV 100 μM em relação à atividade espontânea.

3.4.3 As Ferramentas para a Quantificação dos Sinais MEA

De maneira geral, algumas ferramentas fizeram uma quantificação mais adequada do comportamento do sinal da matriz microeletrodo do que outras. A Detecção de Picos parece ser a ferramenta mais apropriada para este tipo de sinal, uma vez que o importante é quantificar o número de vezes em que a cultura emitiu potenciais de ação (picos), do que a amplitude ou mesmo a frequência em que esses foram emitidos.

Através da Detecção de Picos, observou-se a diferença significativa de atividade entre a situação espontânea e de estímulo químico, na qual o fármaco APV, adicionado a uma concentração de 100 μM , bloqueou parte da atividade original que havia na cultura. Por outro lado, essa ferramenta não é capaz de oferecer nenhuma informação a respeito das frequências mais significativas em cada situação.

Ainda, a partir da análise da similaridade dos sinais em cada canal da MEA, através do cálculo da Coerência e da função Autocorrelação, foi possível estimar quais neurônios estão estabelecendo contato com outros, formando sinapses, e onde se encontra essa rede neural. Além disso, os resultados do cálculo da Coerência em cima dos sinais de cada situação mostraram também como a atividade neural foi enfraquecida pelo APV também em relação a frequência dos disparos, que caiu de 440 Hz, na situação de atividade espontânea, para 40 Hz, depois da adição do fármaco.

Por fim, o cálculo da Transformada de Fourier e consequente cálculo da Densidade Espectral de Potência não ofereceram a mesma vantagem das ferramentas anteriores, pois não apontaram diferenças significativas. Não foi possível fazer uma análise

consistente dos espectros dos sinais devido à grande dificuldade de distinguir as frequências mais significativas, uma vez que os espectros estavam bastante distribuídos. Esta dificuldade pode estar relacionada à composição do sinal, já que o mesmo foi considerado puramente. Provavelmente os ruídos desses sinais devem estar distorcendo totalmente o espectro de frequências do experimento.

3.5 CONCLUSÕES

A partir do processamento dos sinais captados por matrizes multieletrodo utilizando as ferramentas matemáticas propostas, foi possível analisar fisiologicamente e matematicamente os resultados obtidos. As ferramentas utilizadas foram a Transformada de Fourier, Autocorrelação, Densidade Espectral de Potência, Coerência e Detecção de Picos. Em geral observou-se que a maior atividade do canal 78 pode ser explicada devido à presença de mais neurônios formando o sinal, ao contrário do que ocorre nos canais 33 e 43.

Continuando a análise, o APV está diminuindo a amplitude e a frequência de disparos dos neurônios da cultura, o que provavelmente evidencia a dificuldade na formação dos potenciais de ação, já que a ação do fármaco é inibitória. Por fim, entre canais próximos, o sinal observado é similar, já que pode haver neurônios próximos conectados entre si.

Ao realizar a análise com as cinco ferramentas mencionadas, pode-se relatar que para o processamento dos sinais captados por matrizes multieletrodo a ferramenta mais adequada seria a Detecção de Picos, uma vez que possibilita a visualização e interpretação fisiológica dos dados, ou seja, o comportamento da cultura com ou sem a presença do fármaco nos canais selecionados. Por outro lado, confrontando-se os resultados para o cálculo da Coerência, foi possível notar singularidades que não são observadas quando utilizamos a Detecção de Picos, por exemplo, a banda de frequências significativas da atividade neural em cada situação.

Em suma, este capítulo tem suma importância para o aprendizado de diferentes ferramentas matemáticas e para a interpretação dos resultados obtidos a partir do processamento destes mesmos sinais considerando as mesmas condições. Espera-se futuramente aprimorar e automatizar os programas elaborados para processamento dos sinais e também é esperado que mais culturas sejam processadas e analisadas, a fim de descobrir diferentes detalhes que ainda existam acerca do processamento destes sinais em questão.

3.6 REFERÊNCIAS

BERDONDINI, L. et al. Extracellular recordings from locally dense microelectrode arrays coupled to dissociated cortical cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, v.177, p.386–396, 2009.

BLANKENSHIP, A. G.; FELLER, M. B. Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nature Reviews. Macmillan Publishers Limited*. vol. 11, p. 18-29, 2010.

BORGES, T. V.; Processamento de sinais de atividade elétrica neuronal a partir de ferramentas matemáticas clássicas. Universidade Federal de Uberlândia, 2009.

CHIAPPALONE, M.; VATO, A.; TEDESCO, M. B.; MARCOLI, M.; DAVIDE, F.; MARTIONIA, S. Networks of neural coupled to microelectrode arrays: a neural sensory system for pharmacological applications. *Biosensors and Bioelectronics*. vol. 18, p. 627-634, May 2003.

JOHNSON, M.D. et al. Implantable microelectrode arrays for simultaneous electrophysiological and neurochemical recordings. *Journal of Neuroscience Methods*, v.174, p.62–70, 2008.

MARQUES, S. M.; GUZO, M. G.; NEVES, A. F.; OLIVEIRA, M. M.; MACEDO, D. R.; DESTRO-FILHO, J. B., MURTA-JUNIOR, L. O. “Análise da evolução da atividade elétrica espontânea ao longo da maturação de culturas neurais e correlações fisiológicas”. *Revista Horizonte Científico*, 2009, ISSN: 1808-3064. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Uberlândia.

MARTINOIA, S. et al. Electrophysiological activity modulation by chemical stimulation in networks of cortical neurons coupled to microelectrode arrays: A biosensor for neuropharmacological applications. *Sensors and Actuators B*, vol. 108, p. 589-596, 2005.

MULTI CHANNEL SYSTEMS. Microelectrode Array (MEA) - User Manual. Germany, 2005, 54p. Disponível em: <http://www.multichannelsystems.com/.../MEA_Manual.pdf>. Acessado em: Setembro/2009.

SÖRNMO, L., LAGUNA, P. Bioelectrical Signal Processing in Cardiac and Neurological Applications. Elsevier Academic Press 30 Corporate Drive, USA, 668 p, 2005.

YANLING-LI et al. Characterization of synchronized *bursts* in cultured hippocampal neuronal networks with learning training on microelectrode arrays. Biosensors And Bioelectronics, v.22, p.2976-2982, 2007.

Capítulo 4

Análise da Evolução de Culturas Neurais Através da Utilização de Técnicas Clássicas de Processamento de Sinais e DFA

4.1 INTRODUÇÃO

Existem, na literatura, vários estudos relacionados aos dispositivos nanotecnológicos comercialmente disponíveis que acessam seletivamente potenciais de ação de tecidos de neurônios e cardiomiócitos, por exemplo, denominados de Matrizes Multieletrodo (*Multielectrode Array – MEA*), de acordo com (RUTTEN, 2002). Elas são empregadas em estudos da informação biológica neural (RIEKE, 1997), em farmacologia (CHIAPPALONE, 2003) e em neuroimplantes (LITT, 2003). Neste último caso, o autor (TAKETANI, 2006) afirma que a viabilidade de implementação de implantes neurais está intimamente ligada ao desenvolvimento de conhecimento sobre detalhes importantes associados com os dispositivos MEA. Alguns fatores, como a incompatibilidade biológica ou a dificuldade de adesão do tecido ao dispositivo, podem promover uma evolução para a resposta imunológica grave, prejudicando, assim, os pacientes.

Vários artigos na literatura são dedicados ao estudo do processo de conexão funcional entre as células e os microeletrodos, esforço que também permite a compreensão da formação de redes neuronais biológicas (MARQUES, 09; CHIAPPALONE, 2006; KAMIOKA, 1996; VAN PELT, 2004). Esses estudos são baseados na análise da atividade espontânea gravada pelas MEAs. Os principais fenômenos observados na atividade podem ser agrupados em quatro etapas bem definidas na literatura: 1) 1-7 dias *in vitro* (DIV) – pequena quantidade de *spikes* aleatórios, presença de sinapses imaturas e ausência de *bursts*; 2) 08-14 DIVs – pequena quantidade de *bursts* de longa duração (até um segundo), com conexões de rede ainda consideradas imaturas; 3) 15-28 DIVs –

grande quantidade de *bursts* de pequena duração, atingindo valores mínimos de 30 ms, com padrões periódicos repetitivos, revelando sincronismo da atividade observada e 4) 29-35 DIVs – grande quantidade de *spikes* aleatórios, porém com atividade altamente sincronizada entre os canais (eletrodos), revelando que o padrão de conectividade sináptica atingiu a maturidade.

O papel da atividade neuronal espontânea no processo de crescimento celular está relacionado às características de estabilidade e plasticidade dos padrões de atividade. Por outro lado, a apoptose (morte celular normal, fisiológica ou programada) é caracterizada por alterações morfológicas e bioquímicas, sendo estas últimas observadas em condições de estresse, como no caso de deficiência de fatores neurotróficos e exposição a neurotoxinas, incluindo altas concentrações de glutamato. Já o processo de morte celular por necrose é induzido por uma abrupta perturbação ambiental das condições fisiológicas celulares, envolvendo ruptura da estrutura da membrana celular, rápido influxo de íon Ca^{2+} e água e, sequencialmente lise e dissolução da célula (SIMONIAN, 1996).

O estresse oxidativo refere-se às consequências citológicas de uma incompatibilidade entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), provenientes do metabolismo celular, e a capacidade da célula para se defender delas (SIMONIAN, 1996). Esse desequilíbrio gera um acúmulo de moléculas oxidadas (ROS) que podem levar a alterações funcionais de lipídeos, proteínas e DNA, o que resulta na perda progressiva da fluidez da membrana, redução do potencial e aumento da permeabilidade a íons (Ca^{2+}), ocasionando disfunção e morte celular, seja por apoptose ou necrose.

Mecanismos intracelulares podem mediar o estresse oxidativo na degeneração neuronal, como menciona (SIMONIAN, 1996). Destacam-se entre esses mecanismos: as vias de óxido nítrico (NO^-), que, sob condições oxidantes, podem reduzir a neurotransmissão excitatória; as vias de ácido araquidônico (AA), que geram aumento da concentração de cálcio, podendo prevenir contra a degeneração neuronal, promovendo o metabolismo e a ativação de proteases (que são enzimas importantes na quebra de proteínas

modificadas oxidativamente); e a cadeia de transporte de elétrons mitocondriais, que são uma das principais fontes de ROS intracelulares.

Diante dos efeitos do estresse oxidativo na morte celular, as alterações referentes ao aumento da permeabilidade ao íon Ca^{2+} e suas concentrações intracelulares se apresentaram em destaque para o estudo aqui apresentado, levando a possíveis questionamentos: o aumento do fluxo desse íon poderia provocar crescimento da atividade elétrica? Seria essa uma sinalização prévia da morte celular?

Em artigo anterior (MARQUES, 2009), os autores deste trabalho de pesquisa analisaram a dinâmica neural apenas em termos de alguns parâmetros quantitativos extraídos da análise clássica da atividade elétrica.

A seguir, por meio de experimentos próprios, as etapas de evolução celular serão apresentadas, discutidas e caracterizadas quantitativamente, levando-se em conta a evolução temporal da atividade elétrica ao longo das diversas regiões geométricas da MEA e, portanto, da cultura de células, como também principalmente as etapas finais de morte celular.

4.2 ANÁLISE DE FLUTUAÇÕES DESTENDENCIONADAS

Nas últimas décadas, um grande número de esforços tem procurado elucidar os mecanismos fractais e não-lineares envolvidos no controle fisiológico e no comportamento de redes biológicas complexas. A presença de uma dinâmica não-linear tem sido observada em séries biológicas como de variabilidade da frequência cardíaca (GUZZETTI, 1996), eletroencefalografia (MAYER-KRESS e LAYNE, 1987), e na própria descarga elétrica de neurônios (BLESIC et al., 2003). Neste último contexto, a descarga neuronal espontânea é geralmente considerada como um ruído, cuja origem e objetivo funcional ainda são desconhecidos, embora se saiba que esta atividade é responsável por cerca de 80% do gasto energético do cérebro (MAZZONI et al., 2007). No entanto, o estudo de correlações de longo-alcance em sinais neuronais pode revelar informações interessantes, além de simples ruídos, sobre a mudança na comunicação entre os neurônios relacionadas à administração de drogas neuroativas ou devido ao próprio desenvolvimento da rede (BHATTACHARYA et al., 2005; ESPOSTI et al., 2009; SEGEV et al., 2002).

Técnicas estatísticas revelam a presença de correlações de longo-alcance e de leis de potência como parte de cascatas de processos multifractais em sinais fisiológicos. Estas propriedades estatísticas sugerem que os sistemas regulatórios não-lineares operem longe do equilíbrio e que a manutenção da estabilidade não é o objetivo do controle fisiológico (GOLDBERGER et al., 2002). Espera-se que as informações relevantes sobre o comportamento dos neurônios estejam no intervalo entre os *spikes*, ou seja, os eventos de descarga neuronal, da mesma forma que a variabilidade da frequência cardíaca é estudada pelo intervalo entre os picos R de um eletrocardiograma. Dessa forma, métodos como a Análise de Flutuações Destendenciadas (DFA) e quantificadores como o Exponente de Hurst são aplicados sobre séries do intervalo *interspike* (ISI) para observar as mudanças que ocorrem no padrão de disparos dos neurônios em termos de suas componentes não-lineares.

TEORIA

A técnica de DFA (PENG et al., 1995), como o próprio nome indica, realiza a remoção da tendência local da série de dados, analisando o comportamento das flutuações resultantes em função da escala empregada no processo de destendenciamento. O resultado do método é um expoente de escala, aqui chamado ν , que permite a quantificação das correlações de longo-alcance na série de dados.

Sejam $x[i]$ elementos de uma série de intervalos ISI de tamanho N. Inicialmente a série é integrada, subtraindo de cada ponto o valor médio da série, x_{med} , o que corresponde à soma dada por (4.1).

$$y[k] = \sum_{i=1}^k (x[i] - x_{med}) \quad k \in \{1, 2, \dots, N\} \quad (4.1)$$

O sinal integrado é então dividido em intervalos igualmente espaçados de tamanho l .

Para cada intervalo é ajustada uma reta pelo método dos mínimos quadrados, que representa a tendência local do intervalo. Outros tipos de ajustes também são possíveis, fazendo com que a complexidade computacional se altere. Em seguida a série é destendenciada, subtraindo a tendência, $y_l[k]$, em cada intervalo. A raiz quadrada média desta série resultante é então calculada por (4.2).

$$F[l] = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{k=1}^N (y[k] - y_l[k])^2} \quad (4.2)$$

Este cálculo é repetido para todas as escalas possíveis (valores de l). Tipicamente, $F[l]$ aumentará com o tamanho da janela l e seu gráfico em escala log-log (Figura 4.1) terá uma relação linear característica que pode ser caracterizada por um expoente de escala ν , a inclinação da reta de $F[l]$ por l .

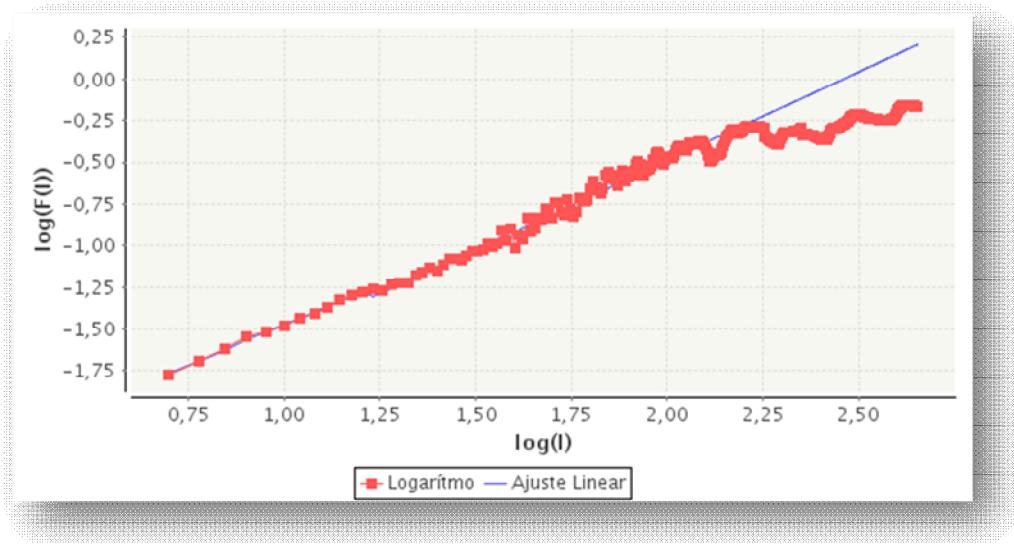


Figura 4. 1 - Ajuste da função $F(l)$ por uma reta no gráfico log-log: o coeficiente angular da reta indica o valor do coeficiente ν . Observa-se o aumento característico de $F(l)$ com o aumento do tamanho da janela l .

Se os valores da série de intervalos estiverem totalmente descorrelacionados, com características de ruído branco, teremos $\nu = 0,5$. Um valor de ν entre $0,5 < \nu < 1$ indica uma correlação persistente de longo-alcance, com intervalos grandes seguidos por intervalos grandes na série original. Já quando ν se encontra entre $0 < \nu < 0,5$ observa-se uma anti-persistência dos valores, com grandes e pequenos intervalos alternando na série de dados. O caso especial $\nu = 1$ corresponde a um ruído $1/f$. Para $\nu > 1$ as correlações existem, embora deixem de ser da forma de lei de potências e para $\nu = 1,5$ tem-se um ruído Browniano, a integral de um ruído branco.

O expoente ν também serve como um indicador da estacionariedade da série de dados. Nesse sentido cabe examinar a relação entre o expoente ν da DFA e o expoente α da densidade espectral de potências (ESPOSTI et al., 2008; PENG et al., 1995), dada por:

$$\alpha = 2\nu - 1 \quad (4.3)$$

O limiar entre sinais estacionários e não-estacionários é dado por $\alpha = 1$. Dessa maneira podem se distinguir diferentes “zonas de estacionariedade”, como indica (ESPOSTI et al., 2008): para $\alpha < 0,5$ o sinal é altamente estacionário e para $\alpha > 1,5$ é altamente não-estacionário, com uma zona de transição entre $0,5 \leq \alpha \leq 1,5$. Dada a correspondência observa-se que $\alpha = 0$ para o ruído branco e $\alpha = 2$ para o ruído Browniano.

A presença de correlações de longo alcance nas séries ISI representa a memória ou história dos padrões de disparo: dois *spikes* não são totalmente independentes mesmo que temporalmente remotos (BHATTACHARYA et al., 2005). Esta é uma característica da dinâmica fractal.

- ✓ Expoente de Hurst

A auto-similaridade pode ser entendida como a semelhança entre as componentes da escala aparente de um objeto e suas subcomponentes, observadas em menores escalas. No contexto de processos estocásticos a auto-similaridade é definida em termos da distribuição estatística do processo. Seja $y(l)$ um processo estocástico (l é um parâmetro contínuo), $y(l)$ é chamado auto-similar com parâmetro de auto-similaridade H (o expoente de Hurst), se para um fator positivo c o processo re-escalonado com escala de tempo $y(cl)$ possui a mesma distribuição estatística do processo original, como indica (4.4):

$$y(l) = c^{-H} y(cl) \quad (4.4)$$

O Expoente de Hurst (HURST, 1951), H , é um fator de escala que atua como um índice de dependência, avaliando a tendência relativa de uma série em regressar a um valor médio ou convergir a uma direção. A estimativa do expoente de Hurst foi originalmente desenvolvida na área da hidrologia, embora as técnicas modernas de estimativa advenham da matemática fractal. As revisões de (ESPOSTI et al., 2008) e (TAQQU et

al., 1995) clarificam os conceitos dos algoritmos mais conhecidos para a análise de séries temporais.

Devido às características estatísticas dos métodos de cálculo do expoente de Hurst, o processo de análise deste expoente deve levar em conta a estacionariedade da série temporal (ESPOSTI et al., 2008). Dessa forma, é prioritário avaliar a estacionariedade da série através de algum método como, por exemplo, o DFA, para daí poder estimar o expoente de Hurst.

Uma das maneiras de estimar o expoente de Hurst é através do método do Periodograma. Inicialmente calcula-se uma estimativa da densidade espectral através da função $I(\lambda)$, como indicada em (4.5).

$$I(\lambda) = \frac{1}{2\pi N} \left| \sum_{j=1}^N X_j e^{i j \lambda} \right|^2 \quad (4.5)$$

Onde λ é a frequência, N é o número de termos na série e X_j os dados. Uma série com dependência de longo alcance apresenta $I(\lambda)$ proporcional a $|\lambda|^{1-2H}$ próximo à origem. Uma regressão linear do gráfico de $\log I(\lambda)$ em relação a $\log \lambda$ resulta no coeficiente $1 - 2H$. Na prática utiliza-se apenas 10% de N/2 frequências para a estimativa de $I(\lambda)$ próximo à origem, diminuindo os custos computacionais (TAQQU et al., 1995).

Para séries com $1/2 < H < 1$ o valor atual da série é afetado não apenas pelos valores mais recentes, mas também por valores temporalmente distantes, o que reflete a capacidade de memória do sistema. Um processo como este é caracterizado por uma dependência de longo-alcance ou, sinteticamente, por um processo com memória. Para $H = 1/2$ os pontos da série de dados estão descorrelacionados e o processo tem característica randômica. Já para $0 < H < 1/2$ o processo possui uma dependência de curto-alcance ou curta-memória, podendo também apresentar valores anti-correlacionados.

No nível celular (neurônios), a atividade é representada pela sequência ISI. Gerstein e Mandelbrot (GERSTEIN e MANDELBROT, 1964) propuseram que a distribuição ISI dos neurônios pode obedecer a uma distribuição de Lévy. A caracterização de séries temporais longas pode ser realizada através das estatísticas no domínio da frequência. Em particular, para sinais longos contendo grandes flutuações e tendências não-estacionárias, o espectro de potências pode ser estimado calculando-se o Periodograma (LOWEN et al., 2001). A distribuição de Lévy na rede de neurônios reflete as propriedades emergentes da rede na qual os neurônios são subsistemas. Em relação aos neurônios, a implicação é que eles também são compostos por subsistemas acoplados de maneira não-linear: os canais iônicos (SEGEV et al., 2002).

No estudo do sistema visual de gatos, um tipo de dependência de longo-alcance ($H > 0,5$) é indicado para células nervosas da retina (LOWEN et al., 2001) enquanto que uma anti-correlação de longo-alcance ($H < 0,5$) para eletroreceptores de *paddlefish* (BAHAR et al., 2001). Esta diferença nos resultados para dois tipos de células nervosas é notada por (ZHONG et al., 2006), que analisou a atividade de células ganglionares da retina, obtendo $H < 0,5$. Já no estudo de (BLESIC et al., 2003), a análise das séries ISI de *dorsal horn neurons* (DHN) indica um comportamento de ruído branco da série ISI, com $H \approx 0,5$. Na presença de estímulos externos, a dinâmica da série se altera para correlações de longo-alcance. Culturas primárias de neurônios corticais do hipocampo, como analisadas pelo presente estudo, possuem o diferencial de estarem distantes de centros de excitação ou sensitivos, fazendo com que sua atividade seja em grande parte devida a um comportamento auto-excitável. Assim, a atividade espontânea observada possui uma menor influência de estímulos externos, o que pode fazer com que as propriedades estatísticas da série se alterem.

4.3 METODOLOGIA

4.3.1 Culturas de células

Graças a uma cooperação técnica existente entre os pesquisadores da Universidade de Gênova (Itália) e os da Universidade Federal de Uberlândia (Brasil), os pesquisadores brasileiros fizeram registros da atividade elétrica de culturas neuronais dissociadas retiradas do córtex de embriões de ratas Wistar, no 18º dia de gestação, incluindo também o preparo dessas culturas. Os procedimentos biológicos e o protocolo de medidas elétricas utilizados pelos pesquisadores brasileiros seguiram as diretrivas apresentadas pela autora (CHIAPPALONE, 2006) e são mostrados a seguir.

Para o preparo da cultura, não foi utilizado nenhum meio condicionado de glia (GCM) ou substâncias antimitóticas para impedir o crescimento desse tipo de células. Ao todo, oito culturas foram monitoradas periodicamente, utilizando matrizes multieletrodo (MEA60) planares de 60 canais, com 30 µm de diâmetro cada eletrodo e com distância de 200 µm entre os eletrodos, distribuídos em uma matriz 8x8, com as extremidades excluídas.

As culturas foram denominadas de experimentos 361, 363, 364, 365, 366, 367, 371 e 372 para os quais se adquiriu a atividade elétrica espontânea, sendo que as gravações ocorreram nos seguintes DIV's:

- ✓ Experimento 361: DIV' 08 ao DIV 15;
- ✓ Experimento 363: DIV' 08 ao DIV 18;
- ✓ Experimento 364: DIV' 08 ao DIV 88;
- ✓ Experimento 365: DIV' 08 ao DIV 67;
- ✓ Experimento 366: DIV' 08 ao DIV 64;
- ✓ Experimento 367: DIV' 15 ao DIV 46;
- ✓ Experimento 371: DIV' 25 ao DIV 46;
- ✓ Experimento 372: DIV' 25 ao DIV 36.

Cada seção de gravação em um DIV durou 20 minutos, divididos em quatro fases subsequentes de cinco minutos cada, totalizando 29 horas de gravação da atividade elétrica das oito culturas e um total de 86 experimentos processados.

Cada registro seguiu o mesmo procedimento: as culturas crescidas sobre as MEAs eram retiradas da estufa de CO₂ na qual eram mantidas e colocadas sobre um amplificador, cuja temperatura era controlada, podendo variar de 37,1 °C a 37,4 °C. As medidas eram iniciadas, decorridos 20 minutos dessa colocação, com o objetivo de permitir às células se adaptarem ao novo ambiente. A frequência de aquisição dos sinais para esses experimentos foi 10 kHz.

4.3.2 Processamento de sinais

O processamento dos dados foi realizado utilizando-se a plataforma *SpikeManager* (VATO, 2004), desenvolvida pela Universidade de Gênova. O *software* foi atualizado, adicionando-se a ele funções responsáveis pelo agrupamento dos dados, pela geração de mapas de atividade da taxa média de disparos de *spikes* (*Mean Firing Rate* – MFR), da taxa média de *bursts* (*Mean Burst Rate* – MBR), entre outras. Além da análise clássica da atividade elétrica realizada a partir dos resultados do processamento pelo *software* *SpikeManager* foram também realizadas análise das mesmas culturas utilizando a técnica DFA através de programas que foram adicionados no *SpikeManager*.

As oito culturas foram analisadas, sendo que três delas apresentaram resistência *in vitro* por um longo período, com dados adquiridos entre 08 e 88 dias *in vitro* (DIVs). Para cada DIV, 20 minutos de atividade elétrica das culturas foram obtidos e a partir deles geradas as séries ISI. Para cada um dos 60 canais da MEA, o tamanho das séries ISI variou em decorrência de atividade mais pronunciada em uma ou outra região da cultura, o que aumenta o número de *spikes* detectados e, consequentemente, aumenta o tamanho da série de intervalos *interspike*.

Os sinais da MEA foram analisados por meio da plataforma *SpikeManager* (COZZI et al., 2005) em Matlab, que executa a análise clássica sobre os sinais. Os intervalos ISI e

estatísticas médias foram calculados sobre todos os sessenta canais da matriz, supondo o mesmo conjunto de parâmetros utilizados para a análise de *spikes*.

Códigos em Matlab previamente desenvolvidos foram utilizados para o cálculo do expoente alfa da DFA (LITTLE et al., 2006) e do expoente de Hurst (CHU, 2008), os quais foram adaptados para as necessidades do estudo. Para cada cultura e DIV, os canais da matriz multieletrodo tiveram suas séries de intervalos ISI analisadas separadamente, gerando um valor do expoente alfa e do expoente de Hurst por canal. Posteriormente foi feita uma média de cada expoente por DIV de uma mesma cultura, para os 60 eletrodos da matriz, obtendo também o desvio padrão das distribuições dos valores.

Por meio do *SpikeManager* e da técnica DFA, os sinais foram processados e vários quantificadores foram obtidos, tais como:

- ✓ Expoente de Alfa;
- ✓ Expoente de Hurst;
- ✓ Gráficos de atividade elétrica normal e espontânea;
- ✓ Gráficos de *raster plot*;
- ✓ Valores médios de intervalo entre *spikes* e *bursts* por experimento em cada DIV;
- ✓ Figuras que mostram o intervalo entre *spikes* e *bursts* por região, assim como o seu desvio-padrão;
- ✓ Estatísticas dos canais da MEA que são constituídos de ruído, *spikes* e *bursts*;
- ✓ Estatísticas dos dados processados: número de *spikes*, número de *spikes* que constituem de *bursts*, *spikes* aleatórios, número de *bursts*, número de *spikes* por *burst* e duração média de *bursts*.

Tais quantificadores serão explicados na próxima seção.

A taxa média de disparos de *spikes* foi calculada considerando-se um valor mínimo de disparos de 0,1 *spikes* por segundo; e uma janela de artefato, de 4 ms. A detecção de *bursts* foi realizada com um número mínimo de *spikes* dentro de cada *burst* igual a cinco; um valor máximo de intervalo entre *spikes* dentro de cada *burst*, de 100 ms; um valor limiar para taxa de *bursts*, de 0,4 *bursts* por minuto e uma janela de artefato, de 4

ms. Tais parâmetros foram ajustados de acordo com procedimento análogo àquele empregado pela autora (CHIAPPALONE, 2003).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na seção anterior foram citados oito quantificadores escolhidos para caracterização da evolução das culturas processadas utilizando o *software SpikeManager* e a técnica de processamento DFA. O resultado deste processamento é mostrado e discutido a seguir. É importante salientar que os valores apresentados a seguir são valores médios dos oito experimentos citados na sessão anterior, exceto os gráficos de Atividade Elétrica Normal e Espontânea, Raster Plot, Region Color ISI, Region Color SD ISI, Region Color IBI e Region Color SD IBI que foram calculados a partir do experimento 364.

4.4.1 Resultados associados ao DFA e expoente de Hurst

A Figura 4.2 mostra os valores do Expoente Alfa (curva em azul) para cada DIV considerado neste trabalho. As barras pretas acima e abaixo da curva azul representam o desvio-padrão do quantificador estudado. Este desvio-padrão foi calculado a partir dos valores do Expoente Alfa dos 60 canais da MEA para cada DIV. O eixo y representa o valor médio do Expoente de Alfa para todos os 60 canais da MEA e o eixo x representa o DIV que está sendo analisado. Observa-se no DIV 08 o menor valor do Expoente de Alfa (-1,20) encontrado com um desvio padrão elevado. Do DIV 11 ao DIV 25 o valor de alfa aumentou de -0,30 até 0,00. Assim sendo, entre 08 e 15-25 DIVs a oscilação dos valores de α abaixo de zero indicam um sinal altamente estacionário com um possível controle momentâneo do crescimento da cultura, com uma atividade semelhante em todos os canais da matriz multieletrodos. Os desvios dos resultados não superam os limites da região de transição entre a estacionariedade e não estacionariedade ($0,5 < \text{alfa} < 1,5$). Estas duas primeiras semanas *in vitro* são marcadas por eventos de grande variação nos valores de alfa, um comportamento de inhomogeneidade que se reflete nas conexões neuronais.

Analizando ainda a Figura 4.2, observa-se do DIV 29 ao DIV 46 que o valor do Expoente de Alfa apresentou um valor próximo de zero, variando muito pouco. O desvio padrão foi pequeno se comparado aos DIV's anteriores. Do DIV 46 ao DIV 60 o valor do Expoente de Alfa diminui de 0,00 até -0,30. Neste período o desvio padrão é

maior apresentando uma maior variação entre os canais da MEA. É importante observar que o desvio padrão no DIV 50 é muito alto. Do DIV 64 ao DIV 71 o valor do Expoente de Alfa volta a ser praticamente zero e, neste período, o desvio padrão atinge o seu menor valor. Assim sendo, de forma sintética, a partir de 22 até a 60-71 DIVs observa-se uma estabilidade de α em torno de zero, o que é característico de um ruído branco, resultado semelhante ao encontrado por (BLESIC et al., 2003). Neste período a rede de neurônios estaria pronta para transmitir um impulso, com uma atividade elétrica randômica, típica de um sistema em que não haja transmissão de informação relevante, ou esteja imerso em ruído, sendo este térmico ou cinético (ESPOSTI, SIGNORINI e CERUTTI, 2009). A Figura 4.2 mostra claramente uma região de relativa estabilidade a partir deste período, marcando um comportamento maduro da cultura, com uma diminuição das variações do expoente alfa calculados pela DFA e a oscilação desses valores em torno de 0, indicando forte presença de ruído branco nas séries ISI.

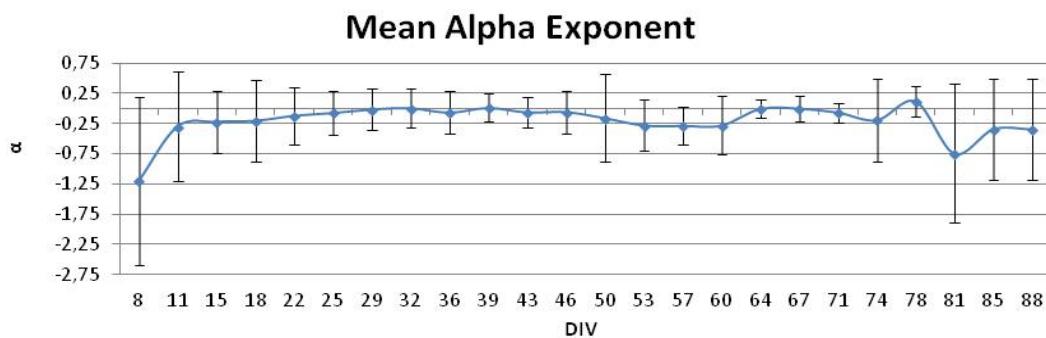


Figura 4. 2 - Expoente de Alfa médio para os DIV's 08 à 88.

Observa-se também que entre os DIV's 74 e 81 da Figura 4.2, há uma variação dos valores do Expoente de Alfa e dos respectivos desvios padrão. No DIV 81 o Expoente de Alfa é muito pequeno se comparado com o DIV 71 e 78. Neste mesmo dia, há um maior valor de desvio padrão. O valor apresentado no DIV 81 é o segundo menor valor encontrado, sendo que o primeiro foi apresentado no DIV 08. Por fim, nos DIV's 85 e 88 o valor do expoente de alfa está em torno de -0,34 e o desvio padrão é o mesmo nos dois DIV's, cerca de 0,83. Estas últimas semanas de registro da atividade elétrica retomam o comportamento observado nas primeiras etapas, com um aumento na variação dos valores. Podemos tratar este fenômeno de aumento das variações na estacionariedade local das regiões celulares como um desacoplamento funcional da

atividade elétrica dos neurônios. Assim, a rede perde sua capacidade de auto-organização, com períodos de grande não-estacionariedade, o que culmina com a morte celular após este período.

Analogamente aos gráficos do Expoente de Alfa, temos a Figura 4.3 que representa o valor médio do Expoente de Hurst para cada DIV com o respectivo desvio-padrão. Assim como na Figura 4.2, o desvio-padrão foi calculado a partir dos valores do Expoente de Hurst dos 60 canais da MEA para cada DIV. O eixo y representa o valor médio do Expoente de Hurst para todos os 60 canais da MEA e o eixo x representa o DIV que está sendo analisado. Entre os DIV's 08 e 18 o valor do Expoente de Hurst varia em torno de 0,50. Observa-se que para este quantificador o valor do desvio padrão permanece o mesmo em todos os DIV's. Os primeiros DIVs analisados (0-21 DIVs) indicam uma oscilação do valor de H seguida por um sutil crescimento, sendo que este crescimento pode ser interpretado como um aumento das correlações de longo-alcance, atingindo um máximo próximo a 18 DIVs. Da mesma forma que observado na análise por DFA, o pico observado neste período deve estar relacionado ao processo de “*pruning*” que ocorre na cultura.

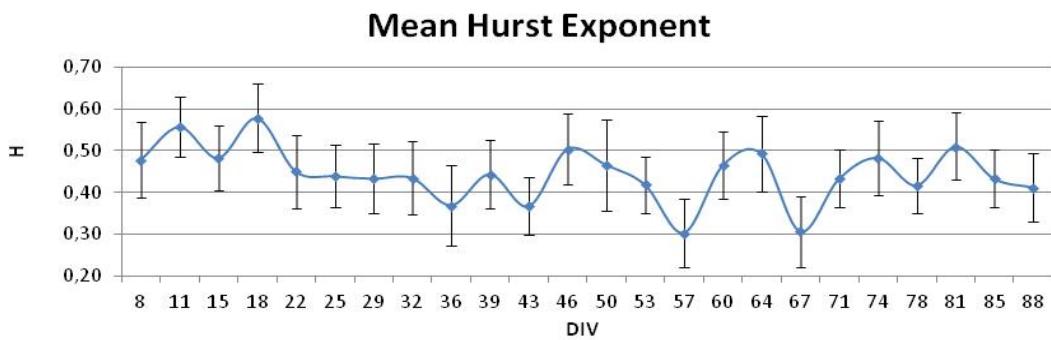


Figura 4.3 - Expoente de Hurst médio para os DIV's 08 à 88.

Do DIV 22 ao DIV 32 o valor do Expoente de Hurst apresentado na Figura 4.3 é constante e igual à 0,43 aproximadamente. Entre os DIV's 36 e 43 o valor deste quantificador varia em torno de 0,40. Já do DIV 46 ao 57 o Expoente de Hurst diminui de 0,50 até atingir o valor mínimo de 0,30. Nos DIV's 60 e 64 o valor volta a aumentar até 0,50 e, posteriormente, no DIV 67 diminuir até atingir 0,30. Em resumo, entre 22 e 71 DIV, exibe certa estabilidade dos valores de H em torno de 0,5 para duas das culturas

o que é característico de ruído branco e corrobora as observações feitas a partir da análise por DFA e obtidas por (BLESIC et al., 2003). Além disso, a dispersão dos valores diminuiu o que indica que, de um modo geral, atingiu-se um comportamento semelhante nos diferentes sítios da rede. Embora uma das culturas tenha apresentado valores de H próximos a 0,3 nesta etapa, manteve-se certa estabilidade neste valor por volta dos 13 DIVs subsequentes.

Por fim, na Figura 4.3, entre os DIV's 71 e 88, o Expoente de Hurst varia entre 0,40 e 0,50. A última etapa dessa análise mostra uma perda das propriedades fractais, devido a um excesso de ordem ou randomicidade descorrelacionada (GOLDBERGER et al., 2002) da série de dados. Esta alteração é perceptível tanto pela variação do expoente H quanto pelo aumento da dispersão dos valores. Novamente, podemos relacionar este processo com a proximidade morte celular e, paralelamente, estabelecer a conexão com a perda das propriedades fractais que ocorre em situações patológicas na análise da variabilidade da frequência cardíaca como indicado por (BARQUERO-PÉREZ et al., 2008; GOLDBERGER et al., 2002; WU et al., 2009).

4.4.2 Resultados ligados ao processamento clássico via *SpikeManager*

As Figuras 4.4(A-D) são gráficos que mostram a evolução da atividade elétrica espontânea do canal 83 do experimento 364, observando-se inicialmente na Figura 4.4(A) uma pequena quantidade de picos, com predominância de atividade basal. Já na Figura 4.4(B), a atividade elétrica aumenta desordenadamente, visto que existem picos de -300 até 150 μ V. Nas Figs 4.4(C) e 4.4(D), a quantidade de picos é ainda mais expressiva.

Os próximos gráficos apresentados são aqueles de *Raster Plot* que mostram o comportamento do sinal de cada eletrodo ao longo do tempo, em relação ao disparo de *spikes*. Nestes gráficos representados pela Figura 4.5(A-I) cada número na vertical (eixo y) representa os eletrodos ou canais da cultura, e na horizontal (eixo x) tem-se o tempo em segundos. Para cada eletrodo pode ser vista a quantidade de *spikes* detectados

durante os 20 minutos (ou 1200 segundos) de experimento. Neste trabalho são mostrados apenas os gráficos de *Raster Plot* para o experimento 364.

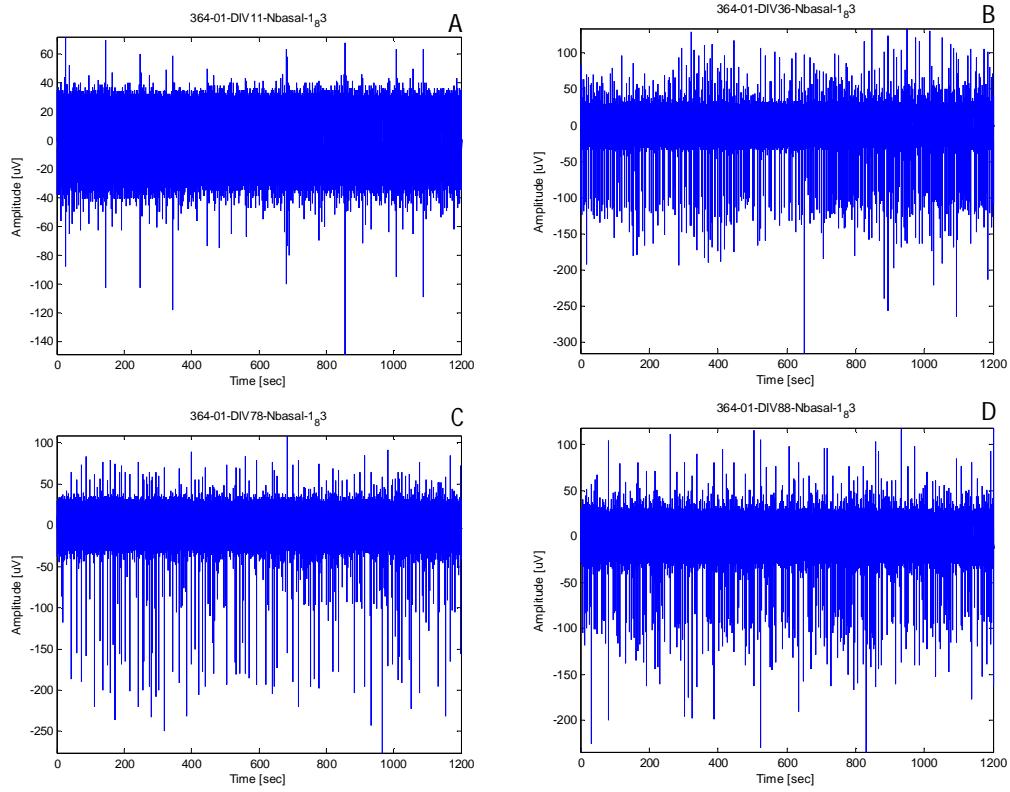


Figura 4.4 - Gráficos de atividade elétrica do experimento 364, canal 83: (A) DIV11, (B) DIV36, (C) DIV78 e (D) DIV88

O objetivo desses gráficos (Figura 4.5) é possibilitar uma rápida visualização geral do estado de ativação elétrica do tecido analisado, considerando os 60 microeletrodos ao mesmo tempo, e não informações detalhadas de cada microeletrodo, o que explica a organização da Figura 4.5, em que vários gráficos são colocados em sequência.

Analizando a Figura 4.5, observa-se no DIV 08 que a quantidade de *spikes* apresentada no *Raster Plot* é muito pequena e que esses *spikes* são bastante espaçados entre si. Comparado ao DIV 08, o DIV 18 apresenta uma atividade elétrica maior e mais distribuída. No DIV 29 é possível visualizar uma quantidade considerável de *spikes* ao longo dos 60 canais. A atividade elétrica estabelece um padrão de disparos sincronizado e intenso, ou seja, surgem padrões de atividade elétrica, tais como o disparo simultâneo de *spikes* em mais de um canal. O DIV 53, por sua vez, se comparado com o DIV 29,

apresenta comportamento semelhante, porém com uma atividade elétrica menor e mais espaçada entre si. Observa-se também que o sincronismo continua evidente neste DIV.

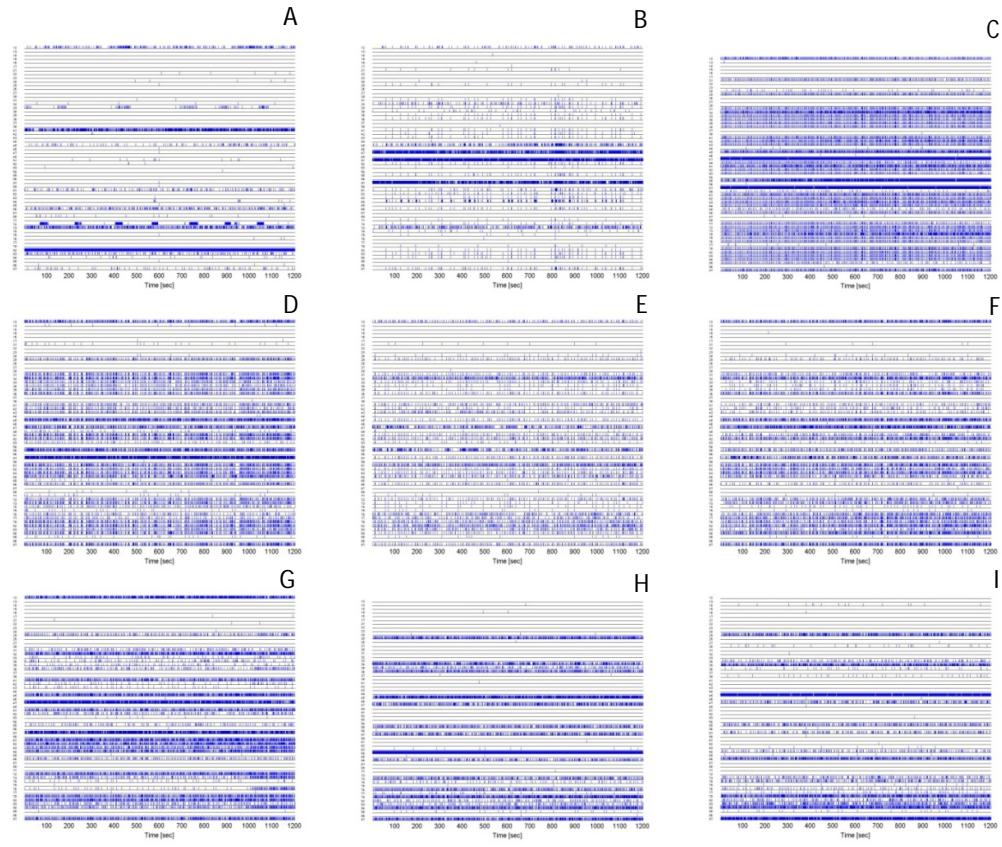


Figura 4.5 - Gráficos de *Raster Plot* do experimento 364: (A) DIV 08, (B) DIV 18, (C) DIV 29, (D) DIV 53, (E) DIV 67, (F) DIV 71, (G) DIV 74, (H) DIV 81 e (I) DIV 88.

A quantidade de *spikes* apresentada no *Raster Plot* (Figura 4.5) do DIV 67 é menor do que a apresentada nos DIV's 29 e 53. Além disso, pode-se perceber que não mais existem padrão de disparos de *spikes* e ocorrência de *bursts*. Os DIV's 71 e 74 possuem um comportamento semelhante ao DIV 67, porém alguns canais deixam de apresentar *spikes* e em outros a atividade elétrica se intensifica. A atividade elétrica apresentada no DIV 81 é muito menor do que nos DIV's anteriores (DIV 18-78). Observa-se ainda que nos poucos canais onde esta atividade existe, ela é intensa e sincronizada. Por fim, no DIV 88 a quantidade de *spikes* apresentada é muito pequena e ela só existe em alguns poucos canais da MEA. Observa-se, em geral, que no final da vida da cultura a quantidade de *spikes* diminui consideravelmente e tende a ocorrer segundo o padrão inicial de disparos no sentido inverso.

O gráfico apresentado na Figura 4.6 mostra os valores de ISI (*Inter Spike Interval* - intervalo entre *spikes*) calculados a partir do vetor de trem de *spikes* fornecidos pelo *software SpikeManager*. O eixo y mostra o intervalo entre *spikes* em milissegundos e o eixo x mostra o dia *in vitro*. Para cada DIV, tem-se uma média dos valores de ISI dos 60 canais da MEA. As variações mostradas em cada DIV representadas pelas barras verticais acima dos valores de ISI representam o desvio-padrão do ISI para o respectivo DIV.

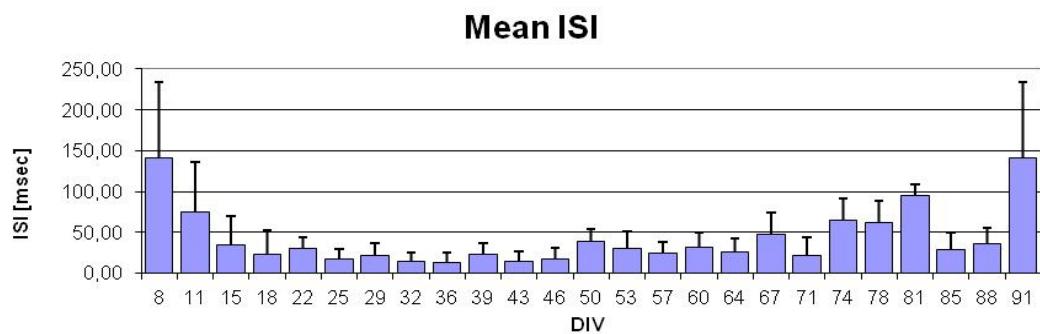


Figura 4.6 - Intervalo entre *spikes* (ISI) médio para todas as culturas ao longo do tempo.

Observa-se na Figura 4.6, DIV 08 que o valor do intervalo entre *spikes* (ISI) e do desvio padrão é o maior encontrado, ou seja, existem poucos *spikes* neste DIV e o intervalo entre eles é grande, em torno de 140 milissegundos. O maior desvio-padrão encontrado indica diferentes comportamentos nos canais com atividade elétrica. Nos DIV's 11, 15 e 18 o intervalo entre *spikes* diminui e a variação apresentada através do desvio padrão também diminui. Observa-se então, neste período, que há um aumento de *spikes* devido à diminuição do intervalo entre eles. Devido à esse aumento de atividade elétrica, pode-se dizer que os neurônios começam a estabelecer uma conexão entre eles. Entre os DIV's 22 e 46 o intervalo entre *spikes* permanece pequeno, revelando uma alta incidência de *spikes*. O desvio padrão, por sua vez, também continua pequeno, indicando comportamentos semelhantes nos diversos canais. Neste período percebe-se que a atividade elétrica é intensa e constante.

Ainda observando a Figura 4.6, do DIV 50 ao DIV 71 vê-se uma pequena variação do intervalo entre *spikes* e do desvio padrão. Esta variação revela inicialmente uma pequena diminuição e posterior aumento da atividade elétrica devido ao aumento e posterior diminuição do intervalo entre *spikes*, se comparado ao período anterior (DIV 22-46). Entre os DIV's 74 e 81 o valor do intervalo entre *spikes* e do desvio padrão aumentam revelando uma diminuição da quantidade de *spikes*. Tal comportamento se dá provavelmente pelo início da morte celular da cultura. Particular atenção deve ser prestada ao aumento repentino da quantidade de *spikes* nos DIVs 85-88, que antecede a morte celular. De fato, medidas tomadas no 91º DIV evidenciaram atividade elétrica global praticamente nula.

Analogamente ao que foi apresentado na Figura 4.6, a Figura 4.7 mostra valores médios de intervalos entre *bursts* (IBI). Para cada DIV, tem-se uma média dos valores de IBI dos 60 canais da MEA. As variações mostradas em cada DIV representadas pelas barras verticais acima dos valores de IBI representam o desvio-padrão do IBI para o respectivo DIV.

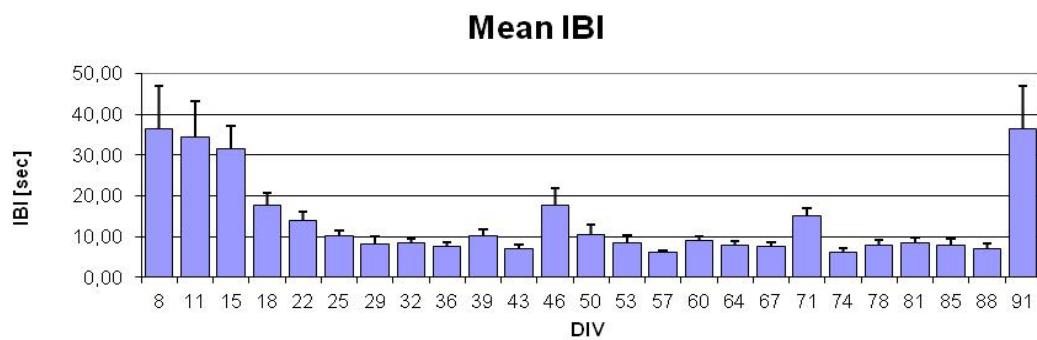


Figura 4.7 - Intervalo entre *bursts* (IBI) médio para todas as culturas ao longo do tempo.

Nos DIV's 08 e 11 da Figura 4.7 observa-se que não existem *bursts* ou eles são desprezíveis visto que o intervalo entre eles é elevado em relação aos demais DIV's. No DIV 15 há o início da formação de *bursts* com um intervalo entre eles muito grande e um alto desvio padrão, conforme apresentado nesta figura. Nos DIV's 18, 22 e 25 observa-se uma diminuição do intervalo entre *bursts* e do desvio padrão, revelando um aumento da quantidade de *bursts*, o que denota um crescimento da atividade elétrica.

Entre os DIV's 29 e 43 o intervalo entre *bursts* é pequeno assim como o desvio padrão, ou seja, há uma quantidade maior de *bursts* que permanece constante neste intervalo. No DIV 46 há uma diminuição brusca da quantidade de *bursts*, visto que o intervalo entre eles e o desvio padrão aumentam consideralmente.

Entre os DIV's 50 e 67, observa-se na Figura 4.7 que o intervalo entre *bursts* varia muito pouco. Além disso, neste período vê-se que voltam a existir muitos *bursts* com um desvio padrão muito pequeno, ou seja, existe pouca variação desta cultura ao longo destes DIV's. O DIV 71 apresentou um comportamento semelhante ao DIV 46, já que houve uma redução da quantidade de *bursts* devido ao aumento da distância entre eles. Entre os DIV's 74 e 88 observa-se novamente que a quantidade de *bursts* é maior e o desvio padrão é menor do que o DIV 71, 46 e 15. No DIV 91 observa-se um elevado valor de IBI revelando a inexistência de *bursts*. Este fato caracteriza a morte celular da cultura. É importante observar que no DIV 71 há uma sensível redução na quantidade de *bursts*, seguida imediatamente por um aumento repentino em DIV 74-88, o que pode ser considerado como uma verdadeira explosão elétrica.

Calcularam-se também os valores médios de intervalo entre *spikes* por canal em cada DIV por experimento, obtendo-se uma figura similar à Figura 4.8 para cada experimento e para cada DIV. Já na Figura 4.9, observa-se o desvio-padrão do intervalo entre *spikes*. Neste capítulo, mostraremos o comportamento do experimento 364 nos DIV's 08, 18, 29, 53, 67, 71, 74, 81 e 88, a fim de ilustrar as diferenças ao longo da maturação da cultura, incluindo a morte celular. Cada quadrado mostrado representa a localização espacial de um eletrodo da MEA, supondo-se visão superior do dispositivo. Assim, na Figura 4.8, tem-se informação mais detalhada acerca do comportamento médio da atividade elétrica, em termos do ISI, para cada eletrodo, ao longo do tempo. Além disso, deve-se notar que nesta mesma figura os eixos x e y correspondem à localização espacial dos microeletrodos e, portanto, a informação central está concentrada na magnitude do ISI médio, ou seja, na cor de cada quadrado. Ao analisar a Figura 4.8, percebem-se cores diferentes para determinados eletrodos. Do lado direito de cada figura, é possível visualizar uma escala de cores, desde 0 (zero), que é representado pela cor azul-escura, até 500 que é representado pela cor vermelho-escura.

Assim, cada cor das Figuras 4.8 – 4.11 representará um respectivo valor de acordo com a escala de cores posicionada no lado direito de cada figura.

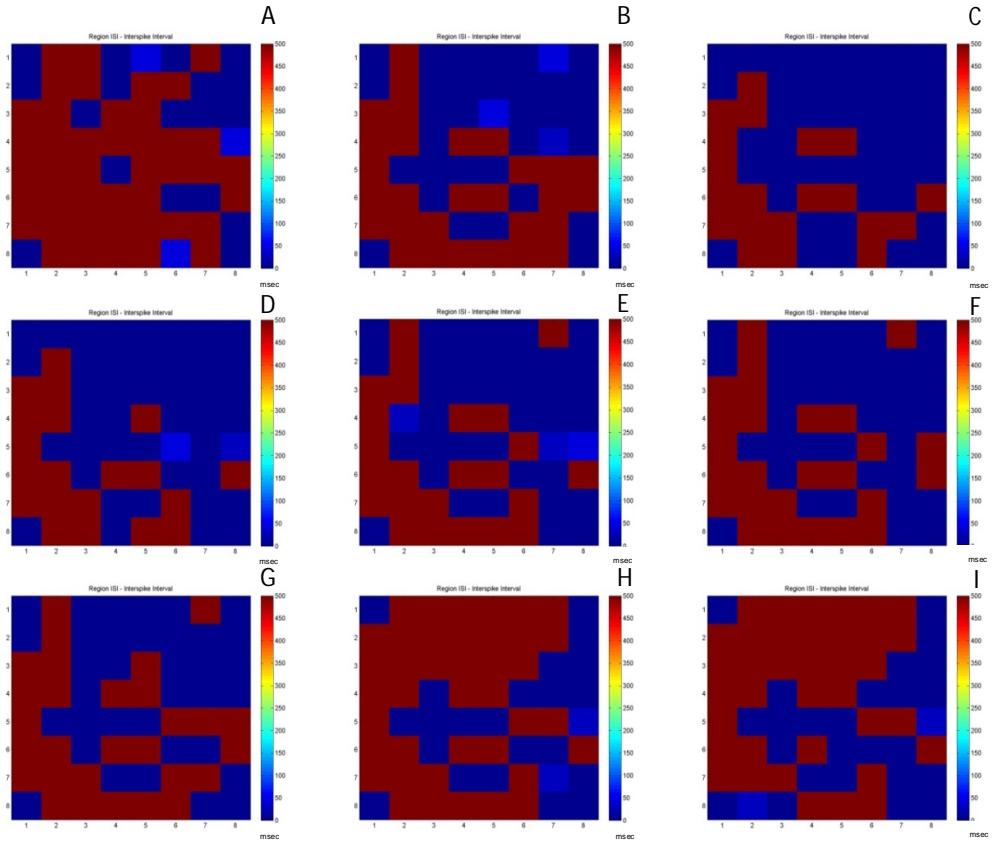


Figura 4.8 - Intervalo entre *spikes* por região para o experimento 364: (A) DIV 08, (B) DIV 18, (C) DIV 29, (D) DIV 53, (E) DIV 67, (F) DIV 71, (G) DIV 74, (H) DIV 81 e (I) DIV 88.

Predominantemente no DIV 08 das Figuras 4.8 – 4.9 é possível visualizar um alto valor de intervalo entre *spikes* na maioria dos canais e um alto desvio padrão revelando uma quantidade de *spikes* muito pequena sendo eles distantes entre si, respectivamente. Comparando o DIV 18 com o DIV 08, observa-se que a quantidade de *spikes* assim como o desvio-padrão aumentam, principalmente no canto superior direito da MEA. O comportamento da cultura no DIV 29 é muito parecido com o comportamento do DIV 18. Ocorreu um pequeno aumento da quantidade de canais com *spikes*, visto que os canais com ISI alto diminuíram. O desvio-padrão, por sua vez, diminuiu em relação aos DIV's anteriores. Observa-se que o DIV 53 tem um comportamento semelhante ao DIV 29. As Figuras 4.8(E-G) mostram o intervalo entre *spikes* por região dos DIV' 67, 71 e

74 e revelam uma diminuição da quantidade de canais com *spikes* e tambem um intervalo entre eles menor, indicando que a cultura já atingiu a maturação. Já as Figuras 4.9(E-G) apresentam um aumento do desvio-padrão, exceto o desvio-padrão do DIV 74 que diminui. Neste período, a tendência é que comece a ocorrer a morte celular da cultura. Os DIV's 81 e 88 apresentam comportamento semelhante da cultura, visto que a quantidade de canais com *spikes* diminui consideravelmente, devido ao aumento do intervalo entre *spikes* médio em cada cultura.

Em particular para a Figura 4.8(I) antecedente à morte celular completa da cultura, existem ainda mais canais ativos, sendo que a inatividade daqueles representados pelo tom vermelho revelador do seguinte fato: o silêncio elétrico completo, característico da morte global da cultura, acontece gradativamente no conjunto de células.

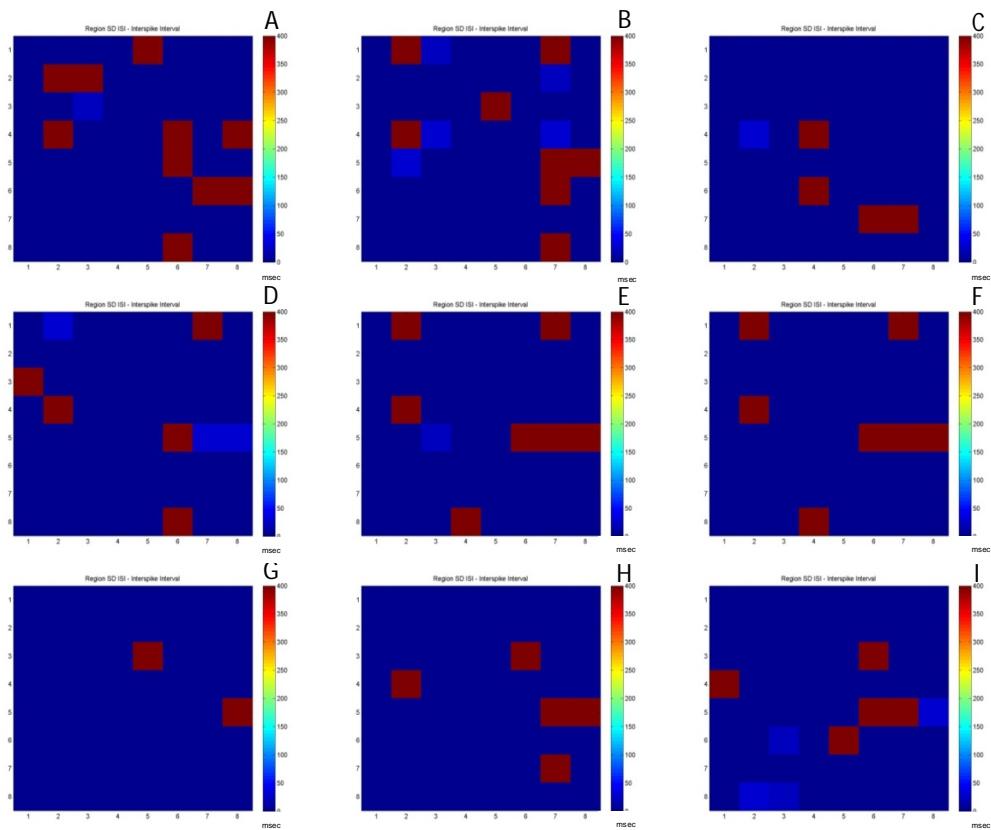


Figura 4.9 - Desvio-padrão do intervalo entre *spikes* por região para o experimento 364: (A) DIV 08, (B) DIV 18, (C) DIV 29, (D) DIV 53, (E) DIV 67, (F) DIV 71, (G) DIV 74, (H) DIV 81 e (I) DIV 88.

Analogamente ao que foi mostrado para o ISI, mostraremos para o IBI (Intervalo entre *bursts*). A Figura 4.10 apresenta os valores médios do intervalo entre *bursts* por canal para o experimento 364. Já na Figura 4.11 é possível visualizar o desvio-padrão do intervalo entre *bursts* para o experimento 364. Assim sendo, na Figura 4.10, tem-se informação mais detalhada acerca do comportamento médio da atividade elétrica, em termos do IBI, para cada eletrodo, que pode ser associado a certo quadrado da figura, ao longo do tempo. Além disso, deve-se notar que nessa mesma figura os eixos x e y correspondem à localização espacial dos microeletrodos e, portanto, a informação central está concentrada na magnitude do IBI médio, ou seja, na cor de cada quadrado.

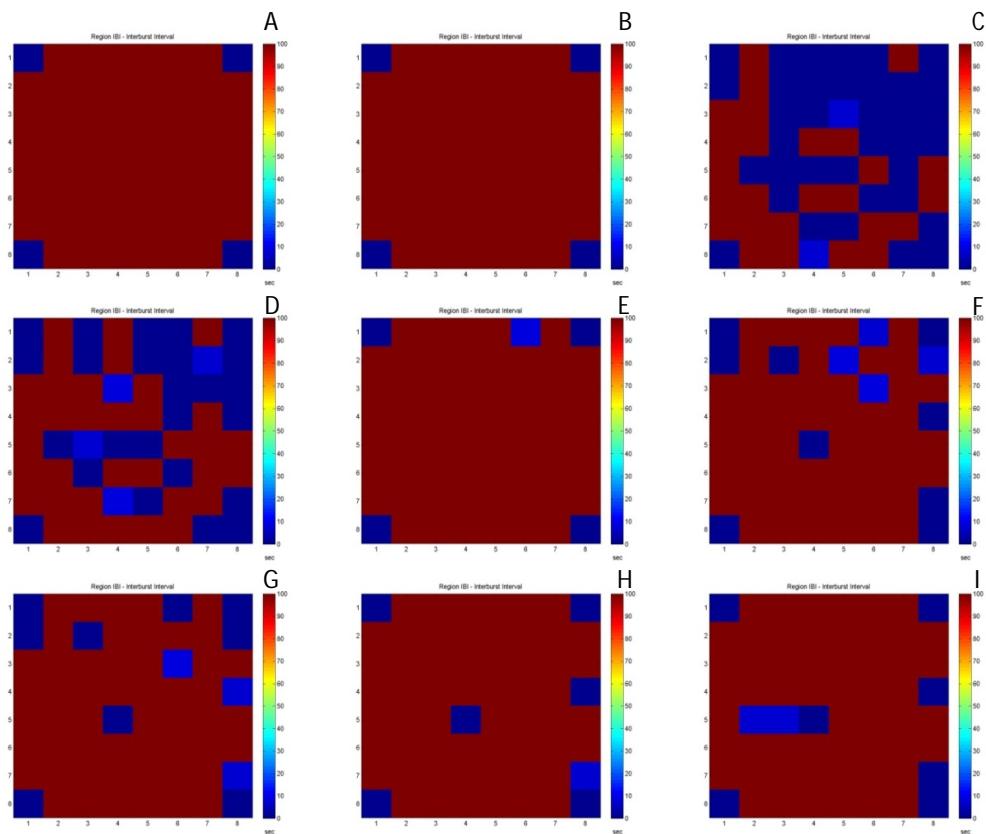


Figura 4. 10 - Intervalo entre *bursts* por região para o experimento 364: (A) DIV 08, (B) DIV 18, (C) DIV 29, (D) DIV 53, (E) DIV 67, (F) DIV 71, (G) DIV 74, (H) DIV 81 e (I) DIV 88.

O intervalo entre *bursts* do DIV 08 mostrado na Figura 4.10(A) tende a infinito, indicando que não existem *bursts* neste DIV. Assim como para o DIV 08, o DIV 18 não apresentou uma quantidade de *bursts* considerável e o desvio-padrão da cultura neste DIV é elevado. É possível visualizar que no DIV 29 a cultura atingiu o máximo de

canais com *bursts* em relação aos demais DIV's. O desvio-padrão muito pequeno revelando uma pequena variação do comportamento da cultura nos diversos canais.

Analizando ainda a Figura 4.10, no DIV 53 observa-se que ainda existem canais com *bursts*, porém eles estão em menor quantidade se comparados com o DIV 29. No DIV 67 observa-se apenas um canal com *bursts*, porém o desvio padrão é elevado. Os DIV's 71 e 74 apresentam mais *bursts* do que o DIV 67, porém com um desvio-padrão maior no DIV 71. Os DIV's 81 e 88 apresentam comportamento semelhante ao DIV 67, visto que a quantidade de canais com *bursts* diminui consideravelmente, assim como o desvio-padrão, evidenciando uma diminuição da atividade elétrica da cultura. Em particular, para a Figura 4.10(I), véspera da morte celular, embora inexistentes *bursts* na grande maioria dos canais, ocorre alguns poucos com intensa duração.

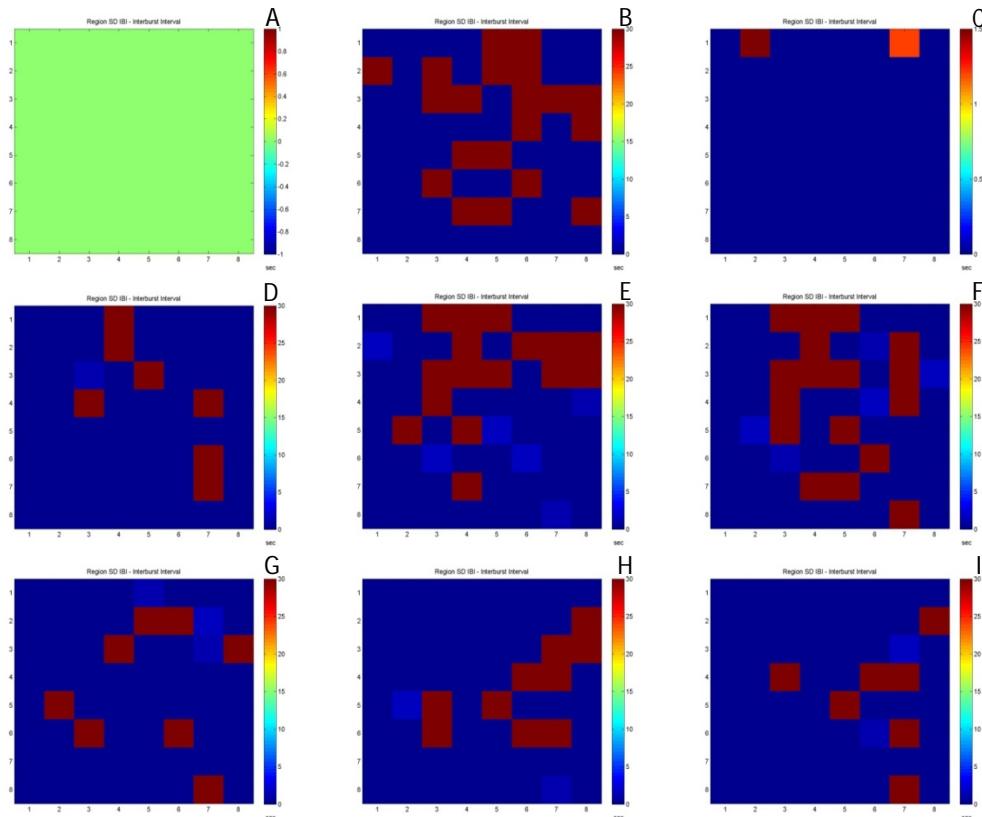


Figura 4. 11 - Desvio-padrão do intervalo entre *bursts* por região para o experimento 364: (A) DIV 08, (B) DIV 18, (C) DIV 29, (D) DIV 53, (E) DIV 67, (F) DIV 71, (G) DIV 74, (H) DIV 81 e (I) DIV 88.

Outro quantificador utilizado no processamento dos sinais registrados a partir das matrizes multieletrodo foi relativo à quantidade de canais que possuem apenas ruído, apenas *spikes* e apenas *spikes* e *bursts*. Este quantificador é apresentado pela Figura 4.12, onde o eixo y representa a quantidade de canais e o eixo x representa os DIVs. Observa-se em tonalidade mais forte a quantidade de canais que possuem *bursts*. A quantidade de canais que possuem *spikes* é apresentada em tonalidade média, da qual a quantidade de canais que possuem *bursts* (tonalidade forte) faz parte. Por fim, a quantidade de canais que possuem apenas ruído, seja de instrumentação ou biológico, é apresentada na tonalidade mais clara.

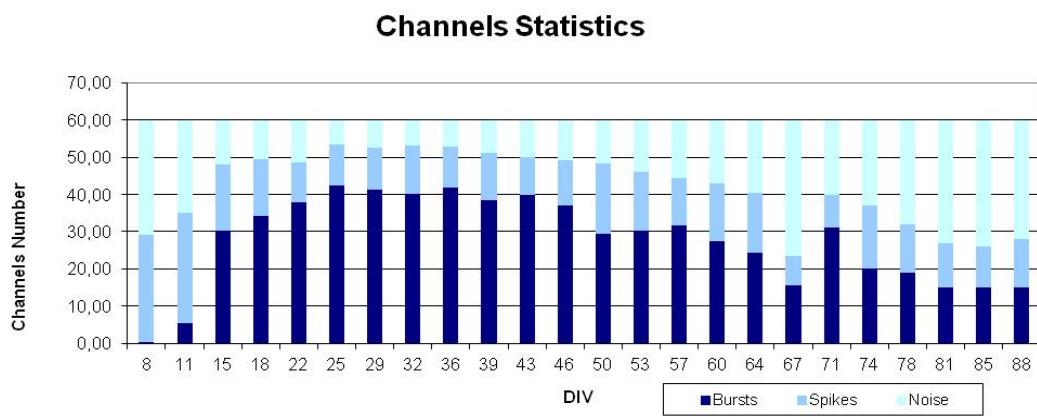


Figura 4.12 - Número de canais que possuem apenas ruído e apenas *spikes* e/ou *bursts* ao longo do tempo, média tomada sobre todas as culturas.

No DIV 08 da Figura 4.12, observa-se que 29 canais apresentam *spikes* e 31 canais apresentam apenas ruído, sendo ruído de instrumentação e ruído biológico. Além disso, neste DIV não existem canais que apresentam *bursts*, o que justifica o comportamento do quantificador IBI. No DIV 11 a quantidade de canais com *spikes* aumentou e, consequentemente a quantidade de canais com apenas ruído diminuiu. Dos 60 canais, 25 possuem apenas ruído e 35 possuem *spikes*. Destes 35 canais com *spikes*, apenas 05 apresentam *bursts*. Dos DIV's 15 ao 36 observa-se uma diminuição dos canais apenas com ruído e um aumento dos canais com *spikes* e com *bursts*. No DIV 15, existem 12 canais com ruído e 48 com *spikes*. Já no DIV 36, apenas 07 canais possuem ruído e 53 possuem *spikes*. Em relação aos *bursts*, dos 48 canais com *spikes* no DIV 15, 30 possuem *bursts* e dos 53 canais com *spikes* do DIV 36, 42 possuem *bursts*.

Na Figura 4.12, do DIV 36 ao DIV 50 observa-se uma diminuição da quantidade de canais com *spikes* e *bursts* e um aumento da quantidade de canais com ruído. Entre os DIV's 53 e 64 a quantidade de canais com *spikes* diminui, porém a quantidade de canais com *bursts* é praticamente constante. No DIV 67 observa-se um aumento brusco da quantidade de canais com ruído correspondente à 37 canais, enquanto que apenas 23 possuem *spikes* e dos 23, apenas 15 apresentaram *bursts*. No DIV 71, o comportamento foi oposto ao apresentado para o DIV 67. Houve um aumento da quantidade de canais com *spikes* e diminuição da quantidade de canais com ruído. A quantidade de canais com *bursts* aumentou de 15 para 31. Entre os DIV's 74 e 88 observa-se um aumento da quantidade de canais com ruído e uma diminuição da quantidade de canais com *spikes* e *bursts*. No DIV 74 observa-se 23 canais com ruído, 37 com *spikes* e 20 com *bursts*. Já no DIV 88 tem-se 32 canais com ruído, 28 com *spikes* e apenas 15 com *bursts*.

Apresentaremos, por fim, as estatísticas dos experimentos processados, conforme Figuras 4.13-4.18. É possível realizar uma comparação em relação aos *spikes* e em relação aos *bursts* dos experimentos analisados neste trabalho.

A Figura 4.13 apresenta o número total de *spikes* médio para cada DIV analisado. O eixo y representa o valor total médio de *spikes* e o eixo x representa o respectivo DIV. Observa-se na Figura 4.13 que nos estágios iniciais (DIV 08 e 11) que o número total de *spikes* da cultura é praticamente desprezível. Nos DIV's 15, 18 e 22 o total de *spikes* cresce lentamente. Nos DIV's 25 e 29 há um aumento maior do total de *spikes*, valor este que volta a diminuir no DIV 32. No DIV 36 a cultura atinge o maior valor total de *spikes*. Já no DIV 39 este valor diminui e volta a aumentar no DIV 43. Nos DIV's 46 à 64 o número total de *spikes* é pequeno se comparado com os DIV's anteriores. No DIV 67 observa-se uma pequena quantidade de *spikes*, a menor apresentada exceto nos DIV's 08 e 11 que não apresentaram *spikes* consideráveis. No DIV 71 o número total de *spikes* volta a aumentar e diminuir lentamente ao longo dos dias até o DIV 85. No DIV 88 há um pequeno aumento do número total de *spikes*.

A Figura 4.14 apresenta o número médio de *spikes* que formam *bursts* em cada DIV. O eixo x representa o DIV analisado e o eixo y representa a quantidade média de *spikes* que constituem *bursts* no DIV em questão. Comparando-se a Figura 4.13 com a Figura 4.14, pode-se observar que o comportamento do quantificador que mostra o número de *spikes* que formam *bursts* é similar ao quantificador do número total de *spikes*.

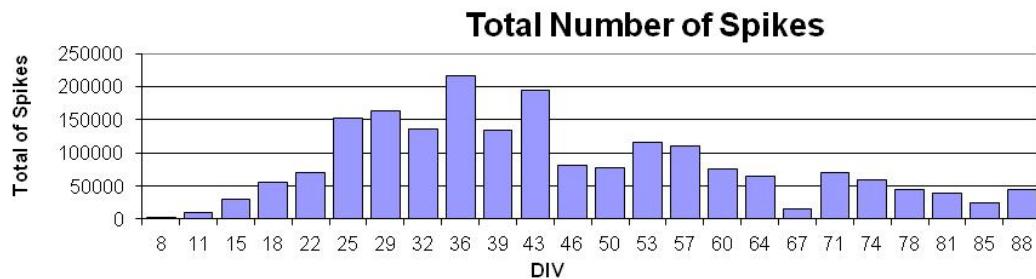


Figura 4. 13 - Número total de *spikes* para cada DIV, média tomada sobre todas as culturas.

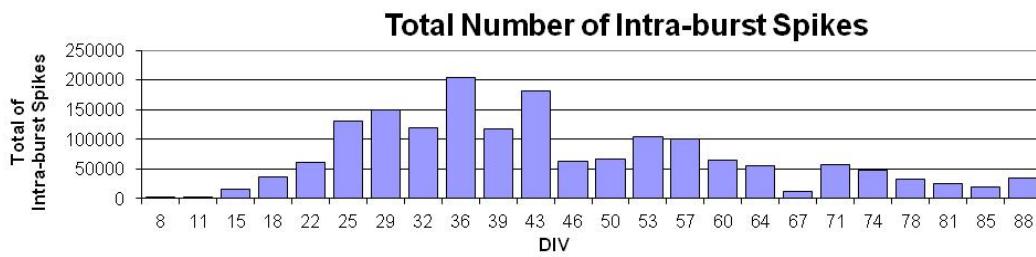


Figura 4. 14 - Número médio de *spikes* que formam *bursts* em cada DIV, média tomada sobre todas as culturas.

Analizando a Figura 4.15 que representa a porcentagem de *spikes* aleatórios para cada DIV, sendo o eixo x o DIV e o eixo y a porcentagem de *spikes* randômicos, observa-se que esta porcentagem varia em torno de 10 a 20% em todos os DIV's, exceto o DIV 08 e 11 que quase não apresentam *spikes*.

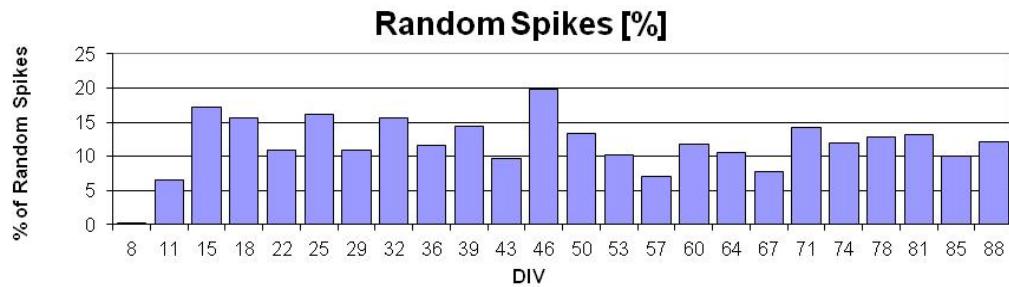


Figura 4. 15 - Porcentagem de *spikes* aleatórios em cada DIV, média tomada sobre todas as culturas.

A Figura 4.16 apresenta o número total de *bursts* para cada DIV. O eixo x representa o DIV e o eixo y representa o número médio de *bursts* para todos os experimentos. Observa-se que o comportamento do quantificador apresentado na Figura 4.16 é similar ao apresentado na Figura 4.13 e 4.14, ou seja, pode-se fazer uma analogia entre os resultados do número total de *spikes* com os resultados do número total de *bursts*.

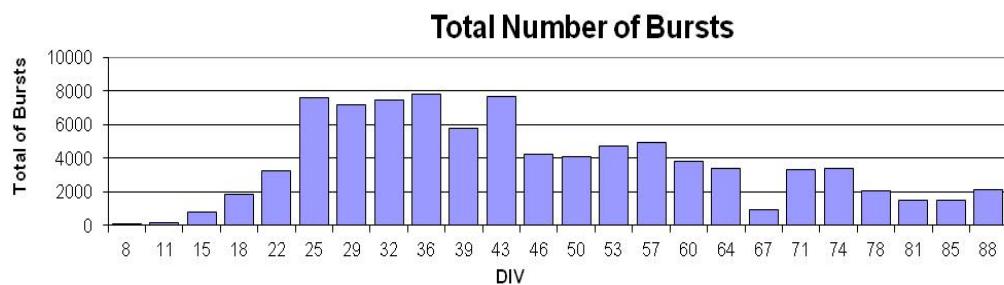


Figura 4. 16 - Número total de *bursts* em cada DIV, média tomada sobre todas as culturas.

A Figura 4.17 apresenta o número médio de *spikes* por *bursts* em cada DIV. Observa-se pela Figura 4.17 nos DIV's 08 e 11 que, como não existem *bursts*, a quantidade média de *spikes* por *bursts* é praticamente zero. Entre os DIV's 15 e 32, a quantidade de *spikes* por *bursts* varia em torno de 10. No DIV 36 observa-se que existem 15 *spikes* em cada *burst* em média. Nos DIV's 39 e 43 a quantidade de *spikes* por *burst* varia em torno de 13.

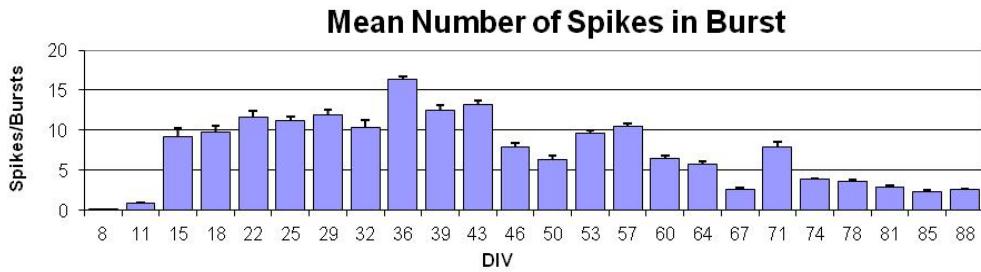


Figura 4. 17 - Número médio de *spikes* por *burst* em cada DIV, média tomada sobre todas as culturas.

Entre os DIV's 46 e 64 da Figura 4.17, observa-se que a quantidade de *spikes* por *burst* varia bastante em cada DIV, chegando a no mínimo 6 e no máximo 12 *spikes* por *burst*. No DIV 67 observa-se uma pequena quantidade *spikes* por *burst*, visto que a atividade elétrica neste DIV diminui consideravelmente. No DIV 71 há um aumento da quantidade de *spikes* por *burst* que parte de 3 no DIV 67 para 08 no DIV em questão. Entre os DIV's 74 e 88 a quantidade de *spikes* por *burst* varia entre 2 e 3.

Por fim, analisando o último resultado estatístico extraído do processamento pelo *SpikeManager* apresentado na Figura 4.18, observa-se que comportamento deste quantificador é similar ao quantificador de quantidade de *spikes* por *bursts* apresentado anteriormente (Figura 4.17). Observam-se inicialmente nos DIV's 08 e 11 que os poucos *bursts* que existem possuem duração muito pequena. Entre os DIV's 15 e 32 os *bursts* possuem duração de 80 ms, atingindo a duração máxima de 110 ms no DIV 36. Este valor diminui até o DIV 64 chegando à 60 ms. No DIV 67 há um decréscimo considerável, visto que dentre os *bursts* existentes, a duração média deles fica em torno de 20 ms. Este valor volta à 80 ms no DIV 71 e volta a diminuir entre os DIV's 74 e 88, quando atinge novamente o valor de 20 ms e, possivelmente, a morte celular da cultura.

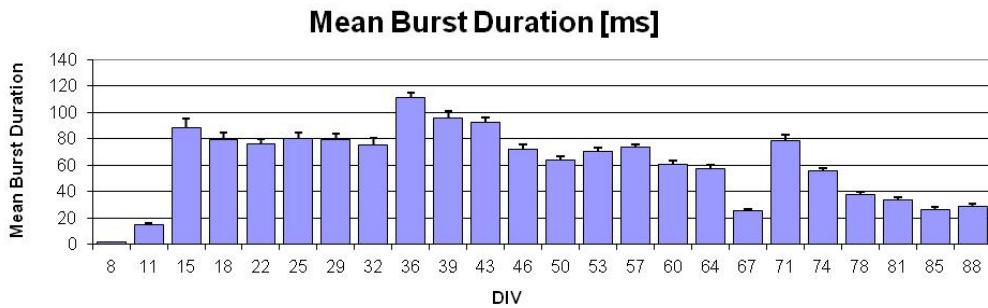


Figura 4.18 - Duração média dos *bursts* em cada DIV, média tomada sobre todas as culturas.

4.4.3 Resultados ligados à morte celular

Em particular, analisando-se os últimos estágios de vida das culturas, correspondentes de 67 DIV até 91 DIV, no contexto específico da cultura 364, a sequência de fenômenos poderia ser resumida como se segue, em três etapas:

- ✓ Fase 1: uma repentina diminuição de todos os eventos. No caso dos *spikes* (Figura 4.6), essa mudança se inicia em DIV74, atingindo um mínimo de *spikes* em DIV81. Já para os *bursts* (Figura 4.7), essa ruptura começa mais cedo, em DIV71. Tanto num caso quanto no outro, o desvio-padrão aumenta consideravelmente, o que implica desorganização da atividade elétrica como um todo. Observações análogas podem ser estabelecidas em termos da quantidade de canais que apresentam *spikes/bursts/ruído* (Figura 4.12). Possivelmente, esses eventos sinalizam o fim da maturidade da cultura e o início da morte celular.

- ✓ Fase 2: em seguida, acontece uma inesperada elevação da ocorrência de *spikes* e *bursts*. Novamente, esse evento é sinalizado mais antecipadamente pelos *bursts*, que em 74 DIV, (Figura 4.7), apresentam valores de IBI tão baixos quanto aqueles observados durante a etapa inicial (veja Figura 4.7, DIVs 8-25). Em termos dos *spikes*, isso ocorre mais tarde, ou seja, conforme Figura 4.6, somente a partir de DIV85, quando o valor médio de ISI atinge também valores tão baixos quanto aqueles observados durante a etapa inicial (veja Figura 4.6, DIVs 15-29). Ao mesmo tempo, comparando-se os desvios-padrão das grandezas IBI e ISI relativamente à Fase 1 descrita no parágrafo anterior, esses parecem diminuir. Observações análogas podem ser estabelecidas em

termos da quantidade de canais que apresentam *spikes/bursts*/ruído (Figura 4.12). Em síntese, a Fase 2 pode ser caracterizada por uma verdadeira “explosão elétrica” sincronizada, com níveis de atividade comparáveis àquele nível do início de vida da cultura.

✓ Fase 3: morte celular propriamente dita, constatada no DIV91 pelo silêncio elétrico total de todos os canais, em que quase não existem nem *spikes*, nem *spikes* randômicos e nem *bursts*. Isso pode ser constatado pelos elevadíssimos valores atingidos por ISI e IBI, respectivamente nas Figuras 4.6 e 4.7.

As conclusões acima apresentadas, obtidas a partir das Figuras 4.6, 4.7 e 4.12, também são facilmente observáveis em termos das estatísticas médias dos experimentos, discutidas nas Figuras 4.13 – 4.18. Assim, resumidamente, em torno de DIV 71, a quantidade média global de *spikes* e *bursts*, bem como a duração média dos *bursts*, cresce explosivamente, atingindo amplitudes e desvios-padrão semelhantes àqueles das primeiras etapas do crescimento da cultura. Estes fatos novamente comprovam a idéia de “explosão elétrica desorganizada”. Em seguida, todos esses indicadores decrescem progressivamente a partir de DIV 74, até atingir o silêncio elétrico. Dentre todos os indicadores, é importante destacar durante a etapa de “explosão elétrica desorganizada”:

- # Quantidade muito elevada de *spikes* aleatórios
- # Quantidade muito elevada de *bursts*
- # Longuíssima duração dos *bursts*

Do ponto de vista dos resultados relatados na seção 4.4.1 em consequência do cálculo do expoente de Hurst e alfa do DFA, pode-se constatar que após DIV74 a variância do expoente alfa do DFA é extremamente elevada e assim persiste até a morte celular, sinalizando claramente uma ruptura no comportamento da atividade elétrica a partir de DIV74 (Figura 4.2), revelando diferentes tipos de estacionariedade dos sinais nos diversos microeletrodos. Já em termos do expoente de Hurst (Figura 4.3), não existe uma diferença claramente perceptível da grandeza nesta etapa.

Outro fato muito importante a ser destacado durante a morte celular envolve a análise das Figuras 4.8 – 4.11. Em particular, as Figuras 4.8(I) e 4.10(I), antecedentes ao final do processo, por caracterizarem o DIV88 durante a “explosão elétrica”, mostram claramente que, apesar do fenômeno em curso, ainda assim muitos neurônios apresentam intensa atividade de *spike* (Figura 4.8(I)), especialmente aqueles em conexão funcional com os microeletrodos situados no lado direito e com os localizados no centro da MEA; enquanto que os neurônios em conexão com alguns poucos microeletrodos situados no centro do dispositivo demonstram gerar intensa atividade de *burst* (Figura 4.10(I)). Para estas duas últimas regiões da MEA, observa-se das Figuras 4.9 e 4.11 um desvio-padrão muito reduzido, revelando, portanto, sincronização dos grupos de neurônios envolvidos.

Assim, pode-se concluir que o silêncio elétrico total do DIV91 é atingido gradativamente ao longo do tempo, estabelecendo-se progressivamente nas diversas regiões topológicas da cultura, como se constata em termos de *spikes* na seqüência de imagens dos DIV53 – 88 para os *spikes* (Figuras 4.8(D)-(I)) e para os *bursts* (Figuras 4.10(D)-(I)). É interessante ainda notar que os microeletrodos situados no centro da MEA parecem ser responsáveis pela “explosão elétrica”, tanto em termos de *spikes* como em termos de *bursts*. Não foi possível encontrar uma explicação fisiológica para essa constatação.

Avaliando as três fases da morte celular apresentadas acima, deseja-se entender a origem da “explosão elétrica” constatada na Fase 2, o que é possível conforme descrição apresentada nos parágrafos 3 a 5 da seção Introdução. Talvez em consequência do processo de apoptose, as alterações referentes ao aumento da permeabilidade ao íon Ca^{2+} e suas concentrações intracelulares poderiam induzir aumento da atividade elétrica, o que poderia explicar o fenômeno constatado nos experimentos.

4.5 CONCLUSÕES

4.5.1 Resultados associados à aplicação das técnicas não-lineares (DFA e Hurst)

Embora a estimativa do expoente α para cada um dos canais resulte em valores bastante dispersos, da mesma forma que o indicado por (ESPOSTI et al., 2009) e (MAZZONI et al., 2007), minúcias da variação coletiva desse parâmetro contêm a informação necessária para observar mudanças no comportamento dos neurônios, no caso de um estudo evolutivo como este, sendo este o motivo da utilização deste tipo de análise. Como indicado por (ESPOSTI et al., 2008), o método empregado para a estimativa do expoente de Hurst deve levar em consideração as propriedades de estacionariedade da série analisada. Uma vez que a série foi caracterizada como altamente estacionária através da DFA, optou-se por utilizar o método do Periodograma (ESPOSTI et al., 2008; TAQQU et al., 1995) para uma melhor estimativa desse expoente.

A análise das propriedades de estacionariedade, memória e fractalidade, dentre os demais conceitos relacionados, constitui um forte indicativo do comportamento e da dinâmica de organismos vivos, como de redes neuronais. Mesmo que sutis, três etapas da maturação de neurônios cultivados em MEA puderam ser caracterizadas, através da análise da atividade elétrica espontânea dos neurônios. A primeira etapa, com alta estacionariedade e grande variabilidade do comportamento nos diversos canais apresenta uma correlação de longo-alcance crescente para a série de dados e tem seu fim marcado por um pico local dos expoentes analisados (α e Hurst). A segunda etapa, quando a cultura atinge sua maturidade, é marcada por grande estabilidade e apresenta características que enquadram a atividade elétrica da cultura na condição de ruído branco, conclusão obtida tanto através da análise do expoente alfa como daquele de Hurst, plenamente de acordo com os resultados relatados em (BLESIC, 2003). A terceira etapa pode ser evidenciada pela elevadíssimo desvio-padrão do coeficiente alfa (revelando uma desorganização da atividade elétrica devido a diferentes tipos de estacionariedade presentes nos microeletrodos, ou perda da capacidade de auto-organização do sistema), retomando as propriedades da cultura imatura, e fornecendo portanto indicativos da iminência de morte celular.

As três etapas de maturação observadas indicam um comportamento semelhante ao descrito por (ESPOSTI et al., 2009), embora apresentem propriedades de estacionariedade e correlações de longo-alcance diferentes. Tais diferenças podem ser devidas ao tipo de dados utilizado, uma vez que (ESPOSTI et al., 2009) utiliza como base para análise a atividade de *bursts* enquanto aqui analisamos a atividade de *spikes*. Como indicado por (SEGEV et al., 2002), a atividade de *bursts* caracteriza a dinâmica neuronal de toda a rede enquanto o potencial de ação (atividade de *spikes*) caracteriza a dinâmica dos neurônios individuais.

A aquisição de séries de dados mais extensas pode reduzir os desvios apresentados e, juntamente com a análise de um maior número de culturas, auxiliará no entendimento dos comportamentos observados no presente estudo, sendo esta uma perspectiva para trabalhos futuros. A aplicação de diferentes métodos e o estudo de séries de intervalos *interbursts* e da duração destes podem também fornecer para medidas mais representativas da dinâmica neuronal em matrizes multieletrodo.

Em síntese, fica claro que os quantificadores do tipo expoente alfa e de Hurst levam a diferentes resultados, e que o expoente alfa se mostrou mais útil na diferenciação das três fases do crescimento da cultura.

4.5.2 Resultados associados à aplicação do *SpikeManager*

Ao analisar o comportamento médio dos experimentos estudados neste trabalho pode-se perceber que inicialmente (DIV 8 – DIV 29) existem poucos *spikes*, com um intervalo de tempo grande entre eles (tipicamente da ordem de 150 ms), ocorrendo de forma desordenada e aleatória, o que se traduz por elevado desvio-padrão do ISI. Existem também poucos *bursts* de curta duração (em média 20 ms) e o intervalo entre eles também é muito elevado (podendo atingir amplitudes da ordem de 35 segundos), assim como o desvio-padrão do IBI.

Nos estágios intermediários (maturidade, DIV 32 – DIV 64), a quantidade de *spikes* e *bursts* cresce expressivamente e, portanto, o intervalo tanto entre *spikes* como *bursts* é

menor (respectivamente 10 ms e 10 s). Nesta etapa, a duração dos *bursts* tende a ser máxima, podendo assumir valores da ordem de 110 s. Ocorre uma verdadeira sincronização entre os diversos sinais, o que leva a desvios-padrão de IBI, de ISI e de duração de *bursts* muito baixos, e a uma quantidade razoável de *spikes* randômicos (da ordem de 20%).

Por fim, nos estágios finais (DIV 67 – DIV 91), a cultura tente à morte celular, os *spikes* e *bursts* gradativamente cessam, inclusive os *spikes* randômicos, sendo que o intervalo entre eles se torna cada vez maior e a duração dos *bursts* cada vez menor (mínimo de 20 ms).

Assim sendo, comparando-se tais resultados experimentais à síntese do conhecimento já estabelecido pela literatura (vide seção 2.5), pode-se constatar que os resultados relatados estão coerentes com o estado-da-arte.

Os resultados obtidos por meio da análise quantitativa da atividade elétrica nos estágios finais de vida das culturas sugerem especulações sobre a existência de etapas no processo de morte celular, partindo-se de uma situação de desorganização dos padrões de disparo, seguida de uma inesperada hiperatividade, e finalizando-se com o silêncio elétrico. Destaca-se aqui uma grande semelhança entre o padrão de atividade elétrica encontrada no estágio inicial de vida da cultura (DIV8-DIV29) e durante as fases 2 e 3 da morte celular (DIV71-DIV91), quando ocorre a “explosão elétrica” seguida pela morte propriamente dita, porém de forma inversa, pois tal atividade a princípio se intensifica a partir de DIV74, para depois se esvanecer totalmente em DIV91. Cogita-se que tal hiperatividade seja explicada pelo rápido efluxo de cálcio ligado à apoptose, item de pesquisa que merece aprofundamento em trabalhos futuros. A partir dos resultados obtidos, os melhores marcadores quantitativos que sinalizam o início de morte celular são:

- # Quantidade muito elevada de *spikes* aleatórios
- # Amplitude e desvio-padrão do ISI médio (tomado sobre todos os canais)
- # Quantidade muito elevada de *bursts*

- # Amplitude do IBI médio (tomado sobre todos os canais)
- # Longuíssima duração dos *bursts*
- # Elevadíssimo desvio-padrão do coeficiente alfa

Fica claro também das Figuras 4.8 – 4.11 que a morte celular é um processo gradual, associado à morfologia da cultura em conexão com os microeletrodos, iniciando-se pelo silêncio elétrico de alguns grupos de neurônios, fenômeno que se intensifica paulatinamente, incluindo a situação em que alguns poucos grupos de células ainda mantém intensa atividade elétrica (grupos estes denominados a partir de agora como “remanescentes”), até que finalmente se constate atividade elétrica zero em todos os microeletrodos indistintamente. Diante desse fato, seria possível cogitar que os neurônios “remanescentes” seriam responsáveis por disparar o processo de morte celular?

Em todo caso, a partir da Figura 4.12, fica muito claro que o processamento de sinais baseado na detecção de *spikes* desconsidera totalmente a informação associada ao ruído biológico. Como este representa quase cerca de 40% da informação presente nos experimentos, então existe não apenas uma enorme perda de informação com o uso destas técnicas clássicas, como também estas inviabilizam o estudo da morte celular da cultura.

4.6 REFERÊNCIAS

BAHAR, S.; KANTELHARDT, J. W.; NEIMAN, A.; et al. Long-range temporal anti-correlations in paddlefish electroreceptors. *Europhysics Letters*, vol. 56(3), p.454-460, 2001.

BARQUERO-PÉREZ, Ó.; DE SÁ, J.M.; ROJO-ÁLVAREZ, J.L.; GOYA-ESTEBAN, R. Changes in detrended fluctuation indices with aging in healthy and congestive heart failure subjects. *Computers in Cardiology*, vol.35, pp. 45-48, 2008.

BHATTACHARYA, J.; EDWARDS, J.; MAMELAK, A. N.; SCHUMAN, E. M. Long-range temporal correlations in the spontaneous spiking of neurons in the hippocampal-amygdala complex of humans. *Neuroscience*, vol. 131(2), p.547-55, 2005.

BLESIC, S.; MILOEVI, S.; STRATIMIROVI, D. Detecting long-range correlations in time series of neuronal discharges. *Physica A: Statistical*, vol. 330, p.391-399, 2003.

CHIAPPALONE, M.; BOVE, M.; VATO, A.; TEDESCO, M.; MARTINOIA, S. Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during *in vitro* development. *Brain Research*, v. 1093, p. 41-53, 2006.

CHIAPPALONE, M; VATO, A.; TEDESCO, M. B.; MARCOLI, M.; DAVIDE, F.; MARTIONIA, S. Networks of neural coupled to microelectrode arrays: a neural sensory system for pharmacological applications. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 18, p. 627-634, 2003.

CHU, C. Hurst parameter estimate function package.
<http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/19148-hurst-parameter-estimate>, 2008.

COZZI, L.; D'ANGELO, P.; CHIAPPALONE, M.; et al. Coding and decoding of information in a bi-directional neural interface. *Neurocomputing*, vol. 65-66, p.783-792, 2005.

ESPOSTI, F.; FERRARIO, M.; SIGNORINI, G. A blind method for the estimation of the Hurst exponent in time series: Theory and application. *Chaos*, vol. 18, p.033126, 2008.

ESPOSTI, F.; SIGNORINI, M. G.; CERUTTI, S. Neuronal networks and Self-Organized Criticality: The rising of long-term memory in neuronal ensembles. *Neural Engineering, 2009. NER 09. 4th International IEEE/EMBS Conference on*, p.538, 2009.

ESPOSTI, F.; SIGNORINI, M. G.; POTTER, S. M.; CERUTTI, S. Statistical long-term correlations in dissociated cortical neuron recordings. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*, vol. 17(4), p.364-369, 2009.

GERSTEIN, G. L.; MANDELBROT, B. Random Walk Models for the *Spike Activity* of a Single Neuron. *Biophys. J*, vol. 4, p.41-68, 1964.

GOLDBERGER, A. L.; AMARAL, L. A.; HAUSDORFF, J. M.; et al. Fractal dynamics in physiology: alterations with disease and aging. *PNAS*, vol. 99(1), p.2466-2472, 2002.

HURST, E. Long Term Storage Capacity of Reservoirs. *Transactions of the American Society of Civil Engineers*, vol. 116, p.770-799, 1951.

KAMIOKA, H. et al. Spontaneous periodic synchronized *bursting* during formation of mature patterns of connections in cortical cultures. *Neuroscience Letters*, v. 206, p. 109-112, 1996.

LITT, B. et al. Translating seizure detection, prediction and brain stimulation into implantable devices for epilepsy. In: *INTERNATIONAL IEEE EMBS CONFERENCE*

ON NEURAL ENGINEERING, 1st ., 2003, Capri Island. Proceedings..., Capri Island, Italy: IEE Conference Publications, 2003. p. 485-492.

LITTLE, M.; MCSHARRY, P.; MOROZ, I.; ROBERTS, S. Nonlinear, Biophysically-Informed Speech Pathology Detection. IEEE Int Conf on Acous Speech and Sig Proc, 2006. ICASSP 2006 Proc, vol. 2, p.1080, 2006.
<http://www.eng.ox.ac.uk/samp/software/cardiodynamicsdfa.m>

LOWEN, S. B.; OZAKI, T.; KAPLAN, E.; SALEH, B. E. A.; TEICH, M. C. Fractal features of dark, maintained, and driven neural discharges in the cat visual system. Methods, vol. 24(4), p.377-394, 2001.

MARQUES, S. M. et al. Análise da evolução da atividade elétrica espontânea ao longo da maturação de culturas neurais e correlações fisiológicas. Horizonte Científico, v. 3, n. 2, 2009.

MAYER-KRESS, G.; LAYNE, S. P. Dimensionality of the human electroencephalogram. Ann. N. Y. Acad. Sci, vol. 504, p.62-87, 1987.

MAZZONI, A.; BROCCARD, F. D.; GARCIA-PEREZ, E.; et al. On the dynamics of the spontaneous activity in neuronal networks. PLoS ONE, vol. 2(5), p.e439, 2007b.

PENG, C. K.; HAVLIN, S.; STANLEY, E. H.; GOLDBERGER, A. L. Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time series. Chaos, vol. 5, p.82-87, 1995.

RIEKE, F. et al. *Spikes: exploring the neural code*. New York: The MIT Press, 1997. 234 p.

RUTTEN, W. L. C. Selective electrical interfaces with the nervous system. Ann. Rev. of Biomedical Engineering, v. 4, p. 407-452, 2002.

SEGEV, R.; BENVENISTE, M.; HULATA, E.; et al. Long term behavior of lithographically prepared *in vitro* neuronal networks. *Phys. Rev. Lett.*, vol. 88(11), p.118102, 2002.

SIMONIAN, N. A.; COYLE, J. T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annual Reviews*, v. 36, p. 83-106, 1996.

STEFANO GUZZETTI. Non-linear dynamics and chaotic indices in heart rate variability of normal subjects and heart-transplanted patients. *Cardiovascular Research*, vol. 31, p.441-446, 1996.

TAKETANI, M.; BAUDRY, M. E. Advances in network electrophysiology: using multi-electrode arrays. United States: Springer-Verlag, 2006.

TAQQU, M. S.; TEVEROVSKY, V.; WILLINGER, W. Estimators for long-range dependence: An empirical study. *Fractals*, vol. 3, p.785-788, 1995.

VAN PELT, J. et al. Long-term characterization of firing dynamics of spontaneous *bursts* in cultured neural networks. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, v. 51, p. 2.051-2.062, 2004.

VATO, A.; BONZANO, L.; CHIAPPALONE, M; CICERO, S.; MORABITO, F.; NOVELLINO, A.; STILLO, G. *Spike manager*: a new tool for spontaneous and evoked neuronal networks activity characterization. *Neurocomputing*, v. 58-60, p. 1153 – 1161, 2004.

WU, G. Q.; ARZENO, N. M.; SHEN, L. L.; et al. Chaotic signatures of heart rate variability and its power spectrum in health, aging and heart failure. *PLoS ONE*, vol. 4(2), p.e4323, 2009.

ZHONG, Q.; BOYKIN, R.; NIRENBERG, S.; ROYCHOWDHURY, V. Non-Poisson Fluctuation Statistics in Neuronal Inter-*Spike* Intervals (ISI): Hurst parameter Estimates

of Mouse Retinal Ganglion Signals. Engineering in Medicine and Biology Society, 2005. IEEE-EMBS 2005. 27th Annual International Conference of the, p.2095, 2006.

Capítulo 5

Análise do Crescimento da Cultura Através do Processamento da Gaussianidade e Estacionariedade

5.1 INTRODUÇÃO

Um processo estocástico pode ser estacionário no sentido amplo e no sentido estreito. Ele é dito ser estritamente estacionário se nenhuma de suas características é afetada por um desvio na origem do tempo (ASSIS, 2011). Já um processo aleatório é gaussiano se as suas variáveis aleatórias tem funções densidade de probabilidade também gaussianas.

Em se tratando da estacionariedade, um conjunto de amostras pode ser proveniente de uma função estacionária no sentido amplo se as distribuições de amplitude e o espectro de potência não forem muito diferentes. Sendo assim, um teste para a estacionariedade de um conjunto de amostras pode ser construído dividindo-se, primeiramente, o conjunto em dois subconjuntos iguais e calculando-se um histograma de amplitude e o espectro de potência para cada subconjunto (McEWEN,1975).

O *Mean Ratio Test* (MRT – Teste Razão Média) pode ser empregado para comparar as funções de distribuição espectral dos subconjuntos de amostras (ASSIS, 2011) a fim de observar se a função é ou não estacionária. Caso haja uma diferença significativa entre os espectros dos subconjuntos amostrais o processo é dito como não estacionário.

Caso o teste da razão média seja significante, há uma mudança na série temporal significante. Para avaliar se a série é estacionária, deve-se compará-la com um valor crítico apropriado. Neste trabalho utilizaram-se os valores críticos apresentados em (ASSIS, 2011).

A verificação da gaussianidade ou normalidade de um conjunto de amostras da MEA se dá pelo teste não paramétrico denominado Jarque-Bera (JB) que possui ótimas

propriedades assintóticas de poder e bom desempenho para amostras finitas. Devido a sua simplicidade, este teste é uma ferramenta útil em análises estatísticas (JARQUE & BERA, 1987). O procedimento para a construção do teste de gaussianidade usa o princípio do método multiplicador de Lagrange, que já foi bastante aplicado em muitos problemas econômicos; por exemplo, (BYRON, 1970), (GODFREY, 1978) e (BREUSCH & PAGAN, 1980).

Em suma, o teste JB testa a hipótese nula de que os dados possuem uma distribuição gaussiana com média e variância desconhecida. Esse teste assume que as amostras são independentes e identicamente independentes. No entanto, essa condição não é muito restritiva porque este teste funciona bem para séries de dados financeiros, onde não se pode assegurar a independência dos dados. Alguns trabalhos da literatura relatam uma limitação do teste JB que é sua sensibilidade à presença de *outliers* na distribuição de probabilidade. No contexto da MEA, tais *outliers* podem estar associados com a presença de *spikes* no sinal (ASSIS, 2011).

5.2 METODOLOGIA

Os dados utilizados neste capítulo foram obtidos de forma análoga à apresentada nos capítulos anteriores. Eles são registros de atividade elétrica de culturas neuronais dissociadas retiradas do córtex de embriões de ratas Wistar, no 18º dia de gestação, gravados por pesquisadores brasileiros em Gênova (Itália). Além dos registros, os pesquisadores brasileiros foram responsáveis pelo preparo dessas culturas. Os procedimentos biológicos e o protocolo de medidas elétricas utilizados pelos pesquisadores brasileiros seguiram as diretrizes apresentadas pela autora (CHIAPPALONE, 2006) e foram apresentados no capítulo anterior.

Para o preparo da cultura, não foi utilizado nenhum meio condicionado de glia (GCM) ou substâncias antimitóticas para impedir o crescimento desse tipo de células. Neste capítulo processou-se apenas uma cultura que foi monitorada periodicamente, utilizando matrizes multieletrodo (MEA60) planares de 60 canais, com 30 µm de diâmetro cada eletrodo e com distância de 200 µm entre os eletrodos, distribuídos em uma matriz 8x8, com as extremidades excluídas. Esta cultura foi denominada de experimento 364 para os quais se adquiriu a atividade elétrica espontânea, sendo que as gravações ocorreram nos DIV's 08, 18, 29, 53, 67, 71, 74, 81 e 88.

Cada seção de gravação em um DIV durou 20 minutos, divididos em quatro fases subsequentes de cinco minutos cada, totalizando 3 horas de gravação da atividade elétrica da cultura. Cada registro seguiu o mesmo procedimento: as culturas crescidas sobre as MEAs eram retiradas da estufa de CO₂ na qual eram mantidas e colocadas sobre um amplificador, cuja temperatura era controlada, podendo variar de 37,1 °C a 37,4 °C. As medidas eram iniciadas, decorridos 20 minutos dessa colocação, com o objetivo de permitir às células se adaptarem ao novo ambiente. A frequência de aquisição dos sinais para esses experimentos foi 10 kHz.

O processamento dos dados foi realizado utilizando-se programas de cálculo de Gaussianidade e Estacionariedade desenvolvidos e discutidos pela autora (ASSIS,

2011). Os mesmos programas foram adequados para os dados processados neste trabalho e são apresentados na seção de anexos (vide item 5.6 Anexos).

Os programas utilizados são responsáveis pelo cálculo da quantidade de segmentos não estacionários e não gaussianos da cultura em análise. Neste trabalho optou-se por calcular o valor da Gaussianidade e Estacionariedade para janelas de 5, 10, 20, 40, 100 e 200 ms, cujos resultados são apresentados na próxima seção.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são apresentados e discutidos os resultados da aplicação dos programas de Gaussianidade e Estacionariedade mencionados na seção anterior. Na Figura 5.1(A) são apresentadas as porcentagens de segmentos não estacionários para os DIV's 08, 18, 29, 53, 67, 71, 74, 81 e 88, sendo cada DIV representado por uma cor, de acordo com a legenda posicionada do lado inferior direito de cada figura. O eixo x representa o tempo em milissegundos e o eixo y representa a porcentagem de segmentos não estacionários. Já a Figura 5.1(B) apresenta o desvio padrão da porcentagem de segmentos não estacionários (eixo y) nos mesmos DIVs apresentados na Figura 5.1(A).

Observa-se na Figura 5.1(A) que a porcentagem de segmentos não estacionários dos DIVs 08, 18, 81 e 88 corresponde aos valores muito próximos evidenciando um comportamento semelhante nos estágios iniciais de crescimento da cultura e nos estágios finais antecedentes à morte celular. A porcentagem de segmentos não estacionários para os DIVs 29 e 53 são os maiores apresentados na Figura 5.1(A). Neste período a cultura atinge a maturidade de acordo com os estudos da literatura. Já nos DIVs 67, 71 e 74 a porcentagem de segmentos não estacionários diminui em relação aos DIVs 29 e 53. A Figura 5.1(B) mostra o desvio padrão da porcentagem de segmentos não estacionários. O valor do desvio é semelhante para todos os DIVs, exceto para o DIV 18 e 81, onde há um valor muito pequeno e muito grande, respectivamente, em relação aos demais DIVs.

Analogamente à Figura 5.1(A), na Figura 5.2(A) são apresentadas as porcentagens de segmentos não gaussianos para os DIV's 08, 18, 29, 53, 67, 71, 74, 81 e 88, sendo cada DIV representado por uma cor, de acordo com a legenda posicionada do lado inferior direito de cada figura. O eixo x representa o tempo em milissegundos e o eixo y representa a porcentagem de segmentos não gaussianos. Já a Figura 5.2(B) apresenta o desvio padrão da porcentagem de segmentos não gaussianos (eixo y) nos mesmos DIVs apresentados na Figura 5.2(A).

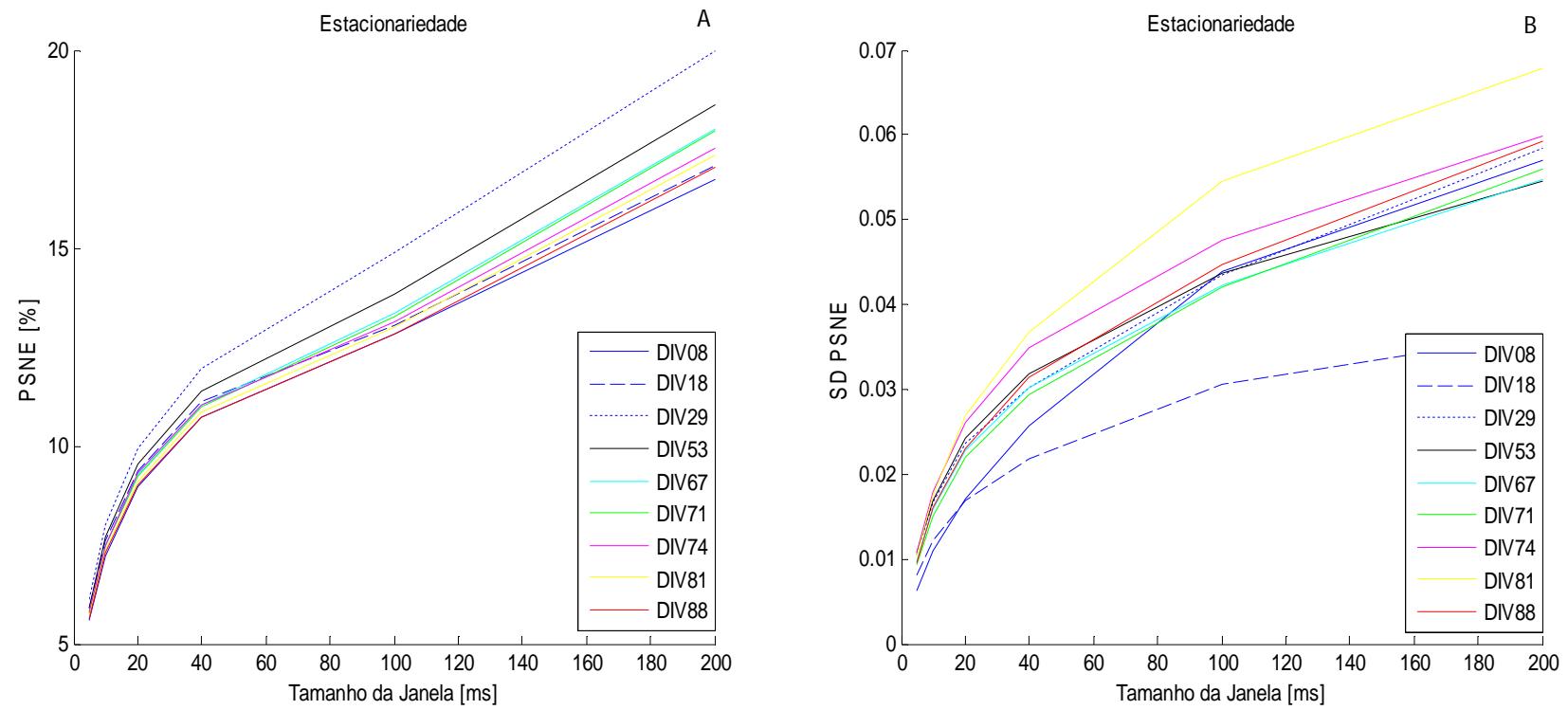


Figura 5.1 - A) Porcentagem de Segmentos Não-Estacionários para os DIV's 08, 18, 29, 53, 67, 71, 74, 81 e 88. B) Desvio Padrão da Porcentagem de Segmentos Não Estacionários para os DIV's 08, 18, 29, 53, 67, 71, 74, 81 e 88.

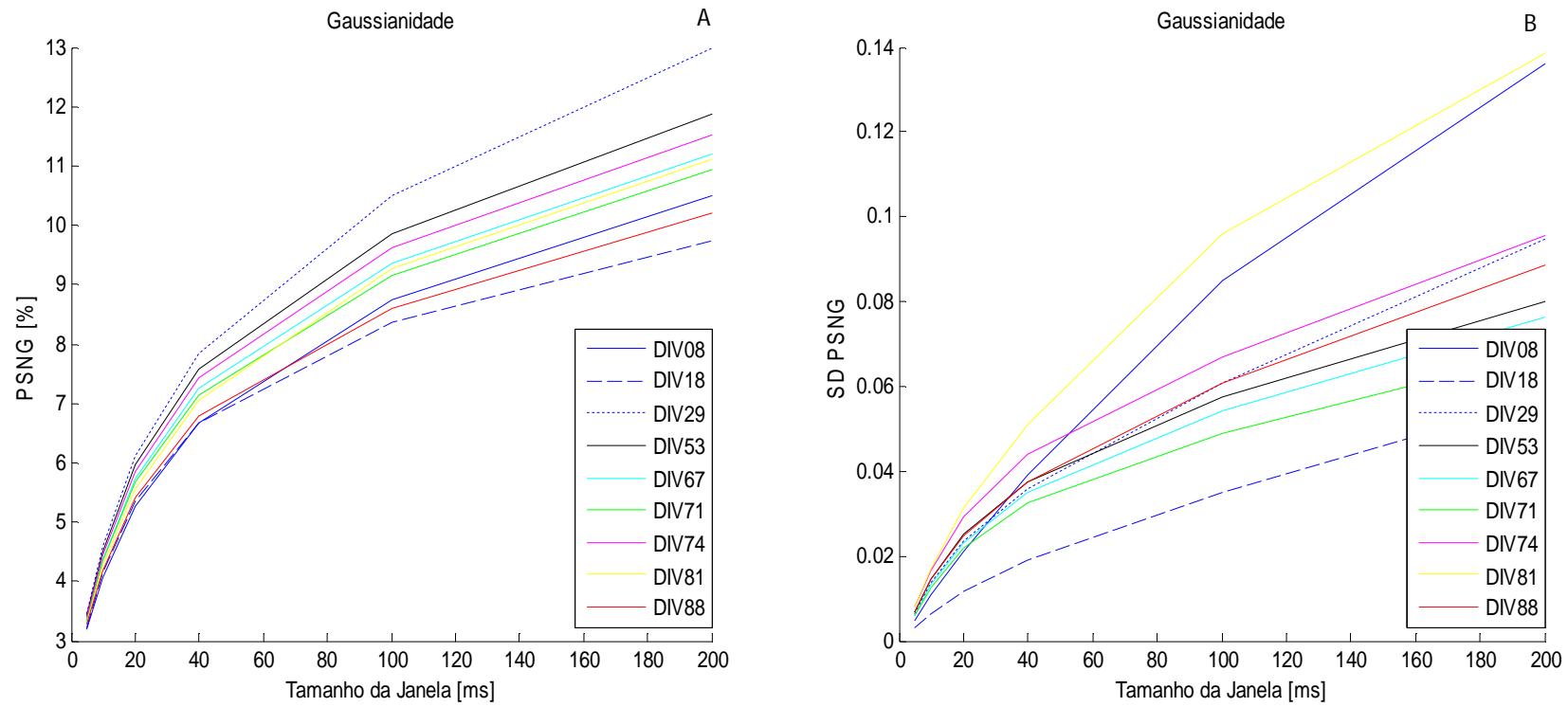


Figura 5.2 - A) Porcentagem de Segmentos Não Gaussianos para os DIV's 08, 18, 29, 53, 67, 71, 74, 81 e 88. B) Desvio Padrão da Porcentagem de Segmentos Não Gaussianos para os DIV's 08, 18, 29, 53, 67, 71, 74, 81 e 88.

A Figura 5.2(A) mostra valores menores de porcentagem de segmentos não gaussianos para os DIVs 08, 18 e 88. Comportamento este semelhante ao visualizado na Figura 5.1(A). Os DIVs 29 e 53 possuem o maior valor de porcentagem de segmentos não gaussianos. Já os DIVs 67, 71, 74 e 81 possuem valores de porcentagem de segmentos não gaussianos intermediários. Observando-se a Figura 5.2(B), de uma maneira geral observa-se que a variabilidade do comportamento não-gaussiano é muito baixa no início de vida e durante a maturidade da cultura (DIV 8 – 74), considerando todo o conjunto de microeletrodos da MEA, porém a partir de DIV81, acontece um pico de grande destaque na variância de PSNG. Ou seja, na etapa final de vida da cultura, este pico revela uma grande diversidade de comportamentos gaussianos do conjunto de sinais, considerando a cultura como um todo.

As Figuras 5.3 apresentam a quantidade de segmentos não-estacionários para a janela de 40 milissegundos em cada canal do experimento 364. Observa-se uma visão geral da MEA a partir destas figuras, em cada DIV. Cada cor de cada quadrado apresenta uma porcentagem de segmentos não-estacionários em determinado canal da MEA. De uma maneira geral, constata-se que há um aumento gradativo da quantidade de canais com comportamento não-estacionário, sendo que o contrário começa claramente a acontecer a partir de DIV 74 (Figura 5.3(G)). Ou seja, ao longo do tempo, o padrão de estacionariedade dos sinais da MEA se modifica do ponto de vista geométrico, até atingir uma homogeneidade a partir do DIV81, o que pode ser interpretado como um sinalizador biológico da morte celular (Figura 5.3(H)). Em particular, no ultimo dia *in vitro* (DIV88, vide Figura 5.3(I)), apesar da grande maioria dos canais apresentarem comportamento estacionário, ainda assim, na parte central do dispositivo, registra-se atividade elétrica altamente não-estacionária.

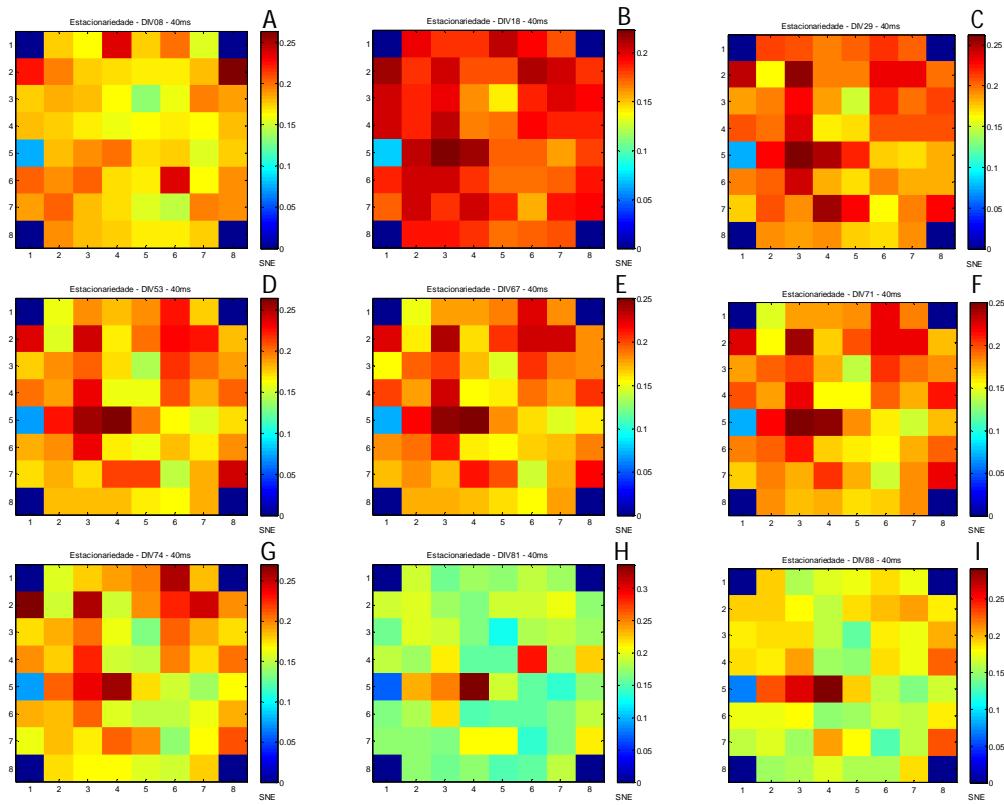


Figura 5.3 - Quantidade de segmentos não estacionários para uma janela de 40 ms: (A) DIV 08, (B) DIV 18, (C) DIV 29, (D) DIV 53, (E) DIV 67, (F) DIV 71, (G) DIV 74, (H) DIV 81 e (I) DIV 88A.

Analogamente às Figuras 5.3, as Figuras 5.4 apresentam a quantidade de segmentos não gaussianos para a janela de 40 milissegundos em cada canal do experimento 364. Observa-se uma visão geral da MEA a partir destas figuras em cada DIV. Cada cor de cada quadrado apresenta um valor de porcentagem de segmentos não-gaussianos detectados em determinado canal da MEA. Todas as conclusões apresentadas no parágrafo anterior à Figura 5.3 são também válidas aqui, porém as palavras “estacionariedade” ou “não-estacionariedade” devem ser respectivamente trocadas por “gaussianidade” ou “não-gaussianidade”.

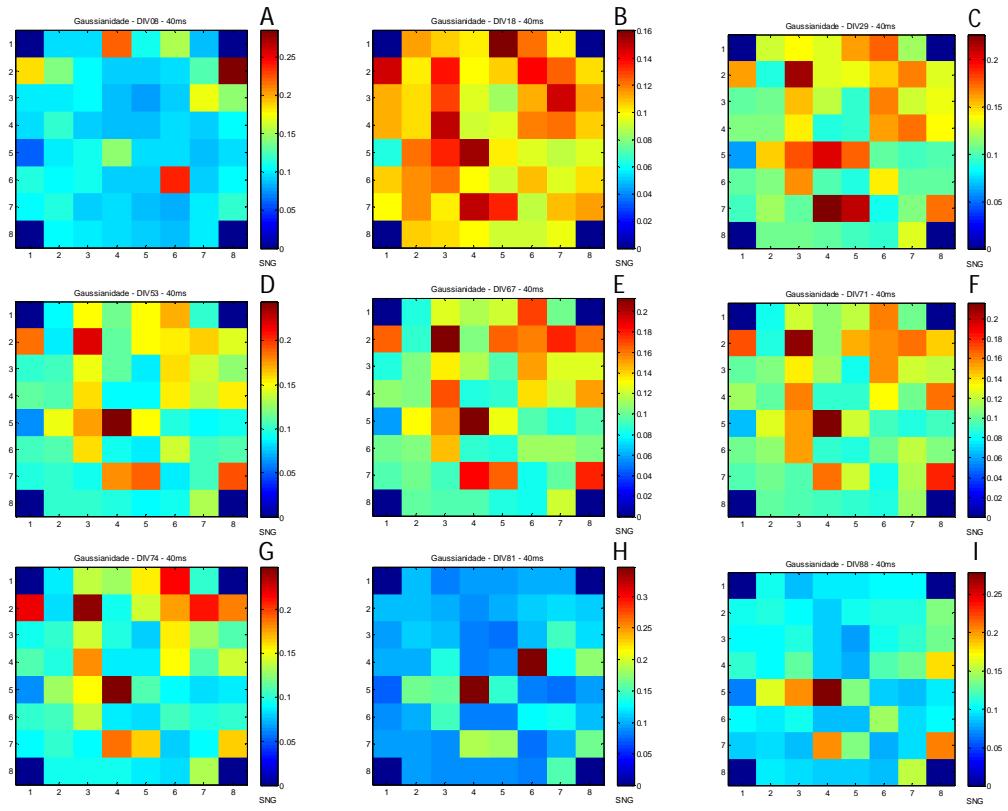


Figura 5.4 - Quantidade de segmentos não gaussianos para uma janela de 40 ms: (A) DIV 08, (B) DIV 18, (C) DIV 29, (D) DIV 53, (E) DIV 67, (F) DIV 71, (G) DIV 74, (H) DIV 81 e (I) DIV 88A.

5.4 CONCLUSÕES

Utilizando-se de testes estatísticos precisos e bem estabelecidos, e analisando-se os sinais de amplitude absoluta registrados em culturas de células durante sua maturação (contrariamente ao capítulo anterior, que apenas considera os *spikes* e *bursts*), pode-se concluir os seguintes pontos relativamente aos experimentos de desenvolvimento tratados tanto neste capítulo quanto no anterior.

- a) Tanto os primeiros DIVs (08 – 18) quanto os finais (DIV 81 – 88) apresentam características muito semelhantes, a saber, atividade elétrica altamente gaussiana e estacionária. Particularmente, durante o período de maturidade da cultura (DIV 29 – DIV 67), os sinais são essencialmente não-gaussianos e não-estacionários.
- b) As conclusões do item (a) acima aplicam-se a praticamente todos os canais da MEA durante 08 – 74 DIVs, de tal forma que as variâncias tanto em termos do caráter gaussiano quanto do estacionário dos sinais medidos são baixíssimas. Todavia, a partir de DIV81, estas duas variâncias são clarissimamente muito diferentes de todas as demais, revelando que a partir desta data o comportamento da atividade elétrica é extremamente desorganizado, variando muito de canal para canal. De fato, levando-se em conta os resultados quantitativos apresentados, a variância de PSNG (Figura 5.2(B)) e de PSNE (Figura 5.1(B)) poderiam ser usados como biomarcadores do início da morte celular.
- c) As conclusões relatadas em (a) e (b) acima, se comparadas com aquelas da seção 4.4, associada à análise DFA e clássica de detecção de *bursts/spikes*, revela grande proximidade. Portanto, pode-se questionar o uso do processamento clássico, cogitando-se a possibilidade de analisar diretamente o sinal de amplitude absoluta da MEA, evitando-se assim a detecção de *spikes*.
- d) Ao longo do tempo de vida da cultura, as características de estacionariedade e gaussianidade se modificam, sendo possível estabelecer um paralelo com o ciclo de vida clássico deste preparo biológico, conforme discutido na revisão da seção 2.4 e nas

conclusões do capítulo 3. Através das Figuras 5.3 e 5.4, é interessante observar que tais modificações ocorrem de maneira diferente nas diferentes regiões geométricas da MEA, sendo que, mesmo próximo à morte celular, ainda assim alguns grupos de neurônios apresentam comportamento típico da maturidade, ou seja, sinais bastante não-gaussianos e não-estacionários.

5.5 REFERÊNCIAS

ASSIS, A. R. Análise da estacionariedade e gaussianidade da atividade elétrica neural do ruído biológico de instrumentação. 2011. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

BREUSCH, T. S.; PAGAN, A. R. The lagrange multiplier test and its applications to model specification in econometrics. Rev. Econ. Studies, v. 97, pp. 239-253, 1980.

BYRON, R. P. The restricted Aitken estimation of sets of demand relations. Econometrica, v.38, pp.816-830, 1970.

CHIAPPALONE, M.; BOVE, M.; VATO, A.; TEDESCO, M.; MARTINOIA, S. Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during *in vitro* development. Brain Research, v. 1093, p. 41-53, 2006.

GODFREY, L. G. Testing for higher order serial correlation in regression equations when the regressors include lagged dependent variables. Econometrica, v. 46, pp. 1303-1310, 1978.

JARQUE, C.M.; BERA, A.K. A test for Normality of Observations and Regression Residuals. International Statistical Review, Vol 55, no 2, pp. 163-172, 1987.

McEWEN, J.A.; ANDERSON, G.B. Modeling the Stationarity and Gaussianity of Spontaneous Electroencephalographic Activity. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, vol. 28, no 5, pp 361-369, 1975.

Capítulo 6

Conclusões e Trabalhos Futuros

Os capítulos 1 e 2 apenas introduziram este trabalho apresentando temas importantes para o entendimento do que o autor propõe. Foram apresentadas o tipo de cultura utilizada neste trabalho, o significado das MEAs, *spikes*, *bursts* e ruído, além de explicar como se faz a detecção de *spikes* e *bursts*. Foi apresentado também o *software* para processamento da técnica clássica de detecção de *spikes* e os quantificadores utilizados na análise dos dados. Por fim, no capítulo 2 foi sintetizado vários artigos encontrados na literatura acerca do desenvolvimento da cultura desde o seu nascimento até a fase de maturação.

O capítulo 3 apresentou ferramentas como a Transformada de Fourier, Autocorrelação, Densidade Espectral de Potência, Coerência e Detecção de Picos para anisar fisiologicamente e matematicamente os sinais processados. Em geral observou-se que a maior atividade do canal 78 pode ser explicada devido à presença de mais neurônios formando o sinal, ao contrário do que ocorre nos canais 33 e 43. A utilização do APV demonstrou a dificuldade na formação dos potenciais de ação, já que a ação do fármaco é inibitória. Por fim, entre canais próximos, o sinal observado foi similar, já que pode haver neurônios próximos conectados entre si.

Constatou-se ainda no capítulo 3 que a ferramenta mais adequada para processamento dos sinais da MEA é a Detecção de Picos, uma vez que possibilita a visualização e interpretação fisiológica dos dados, ou seja, o comportamento da cultura com ou sem a presença do fármaco nos canais selecionados. Por outro lado, confrontando-se os resultados para o cálculo da Coerência, foi possível notar singularidades que não são observadas quando utilizamos a Detecção de Picos, por exemplo, a banda de frequências significativas da atividade neural em cada situação.

Em relação à técnica clássica de detecção de spikes apresentada no capítulo 4, observa-se que os resultados obtidos estão coerentes com o estado-da-arte. Ressalta-se que os resultados obtidos por meio da análise quantitativa da atividade elétrica nos estágios finais de vida das culturas sugerem especulações sobre a existência de etapas no processo de morte celular, partindo-se de uma situação de desorganização dos padrões de disparo, seguida de uma inesperada hiperatividade, e finalizando-se com o silêncio elétrico. A partir dos resultados obtidos, os melhores marcadores quantitativos que sinalizam o início de morte celular são:

- # Quantidade muito elevada de spikes aleatórios
- # Amplitude e desvio-padrão do ISI médio (tomado sobre todos os canais)
- # Quantidade muito elevada de bursts
- # Amplitude do IBI médio (tomado sobre todos os canais)
- # Longuíssima duração dos bursts
- # Elevadíssimo desvio-padrão do coeficiente alfa

É importante observar no capítulo 4 que a partir da Figura 4.12, fica muito claro que o processamento de sinais baseado na detecção de spikes desconsidera totalmente a informação associada ao ruído biológico. Como este representa quase cerca de 40% da informação presente nos experimentos, então existe não apenas uma enorme perda de informação com o uso destas técnicas clássicas, como também estas inviabilizam o estudo da morte celular da cultura.

Em relação ao capítulo 5, observa-se que nos estágios iniciais e finais da cultura as características são semelhantes, apresentando atividade elétrica altamente gaussiana e estacionária. Particularmente, durante o período de maturidade da cultura (DIV 29 – DIV 67), os sinais são essencialmente não-gaussianos e não-estacionários. Pode-se ainda questionar o uso do processamento clássico, cogitando-se a possibilidade de analisar diretamente o sinal de amplitude absoluta da MEA, evitando-se assim a detecção de spikes.

Tabela 6. 1 - Conclusões gerais dos resultados encontrados

Dia In Vitro	Literatura	Análise Clássica e DFA	Estacionariedade e Gaussianidade
01-07 DIV	-Pequena quantidade de spikes aleatórios -Presença de sinapses imaturas -Ausência de bursts	-Alta estacionariedade, variabilidade do comportamento nos canais apresentando correlação de longo-alcance	-Atividade elétrica altamente gaussiana e estacionária.
08-14 DIV	-Pequena quantidade de bursts de longa duração -Conexões imaturas		
15-28 DIV	-Grande quantidade de bursts de pequena duração -Bursts periódicos e repetitivos - Atividade sincronizada		
29-35 DIV	-Grande quantidade de spikes aleatórios -Atividade sincronizada	-Grande estabilidade com características que enquadram a cultura como ruído branco	-Atividade elétrica não-gaussiana e não-estacionária.
36-71 DIV	-Conexões maduras		
72-88 DIV		-Fase 01: desorganização da atividade elétrica como um todo -> fim da maturidade; -Fase 02: inesperada elevação da ocorrência de spikes e bursts -> explosão elétrica sincronizada com níveis de atividade comparáveis ao início de vida da cultura; -Fase 03: morte celular	-Atividade elétrica altamente gaussiana e estacionária. Nesta etapa evidencia-se picos grandes da PSNE e PSNG no final da vida da cultura revelando atividade elétrica desorganizada

É possível observar os principais resultados encontrados a partir deste trabalho na Tabela 6.1. A comparação é realizada ao longo do crescimento da cultura até a sua morte celular e são apresentados os resultados encontrados na literatura, os resultados obtidos através da análise clássica de spikes e DFA e os resultados obtidos através do processamento da gaussinidade e estacionariedade.

Como perspectivas e trabalhos futuros, utilizando as ferramentas apresentadas no capítulo 3, aprimorar e automatizar os programas de Transformada de Fourier, Autocorrelação, Densidade Espectral de Potência, Detecção de Picos e Coerência e também é esperado que mais culturas sejam processadas e analisadas, a fim de descobrir diferentes detalhes que ainda existam acerca do processamento destes sinais em questão.

Deve-se também futuramente, em relação ao capítulo 4, calcular o Expoente Alfa e Expoente Hurst a partir da atividade de bursts a fim de caracterizar a dinâmica neuronal de toda a rede. O cálculo também deve ser realizado para séries de dados mais extensas e um maior número de culturas a fim de reduzir possíveis desvios. Por fim, em relação ao capítulo 5, deve-se aprofundar nas ferramentas abordadas, processar e analisar um conjunto maior de dados.